

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION "PHARMACIE"

par

MOLITOR Adolphe

Pharmacien

Diplômé d'études supérieures de Chimie Biologique

né à LUXEMBOURG, le 23 mai 1929

Sur le dosage de la créatinine dans l'urine et dans le sang

Étude critique — Recherches personnelles

Soutenue le 22 décembre 1955, devant la Commission d'Examen

PRÉSIDENT . . . M. le Doyen KAYSER

JUGES.

{	M. BLOCH, <i>Professeur</i>
	M ^{lle} Besson, <i>Maître de Conférences</i>

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION "PHARMACIE"

par

MOLITOR Adolphe

Pharmacien

Diplômé d'études supérieures de Chimie Biologique

né à LUXEMBOURG, le 23 mai 1929

Sur le dosage de la créatinine dans l'urine et dans le sang

Étude critique — Recherches personnelles

Soutenue le 22 décembre 1955, devant la Commission d'Examen

PRÉSIDENT . . . M. le Doyen KAYSER

JUGES. { M. BLOCH, *Professeur*
 { M^{lle} Besson, *Maître de Conférences*

THÈSE

présentée

A LA FACULTE DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir

le titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION "PHARMACIE"

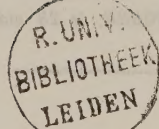
par

MOLITOR Adolphe

Pharmacien

Diplôme d'études supérieures de Chimie Biologique

et de Pharmacie



Sur le dosage de la créatinine
dans l'urine et dans le sang

Étude clinique - Recherches personnelles

Soutenue le 22 décembre 1955, devant la Commission d'Examen

Président : M. le Docteur KAYSER

M. BLOCH, Professeur

M. Besson, Maître de Conférences

Volet

FACULTE DE PHARMACIE
DE NANCY

- ADMINISTRATION -

Doyen : F. KAYSER
Assesseur : A. MEUNIER
Secrétaire : P. RADUREAU

PERSONNEL ENSEIGNANT
PROFESSEURS

M. MEUNIER A.	Pharmacie Galénique
Mle FRANCOIS M.Th.	Matière Médicale
MM. KAYSER F.	Chimie
FRANQUET R.	Botanique
MARCHAL J.G.	Microbiologie
STEIMETZ E.	Sciences Naturelles
BLOCH J.M.	Toxicologie
SOLEIL J.	Pharmacie Chimique

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mle BESSON S.	Pharmacodynamie
N...	Sciences Physiques

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

M. MEUNIER A.	Hydrologie
Mle FRANCOIS M.Th.	Hygiène
MM. FRANQUET R.	Cryptogamie
MARCHAL J.G.	Parasitologie
STEIMETZ E.	Mycologie - Minéralogie
BLOCH J.M.	Chimie Minérale
SOLEIL J.	Chimie organique
ROBLOT R.	Déontologie
(Professeur à la Faculté de Droit)	
BERNANOSE A.	Physique
MIRJOLET M.	Chimie analytique

CHEFS DE TRAVAUX

M. ANZIANI P.	Chimie
Mme LASSEUR A.	Microbiologie - Parasitologie
MM. BERNANOSE A.	Physique
MIRJOLET M.	Sciences Pharmaceutiques
BENE R.	Chargé des travaux pratiques de Microbiologie technique
PIERFITTE M.	Chargé des travaux pratiques de Chimie biologique
VILLOUTREIX J.	Chargé des fonctions de chef de travaux pratiques de Micrographie
N...	Chargé des travaux pratiques de Physique.

Doyen honoraire : M. RICHARD G.- Recteur de l'Académie de Besançon

Professeur honoraire : M. CORDEBARD H.

Maître de conférences honoraire : D^r VERNIER P.

A mes Parents qui m'ont toujours
réservé le meilleur d'eux-mêmes, modeste
témoignage de ma profonde affection et
gage de ma filiale reconnaissance.

A mon Maître et Président de Thèse,

Monsieur le Professeur KAYSER
Doyen de la Faculté de Pharmacie.

A mes Juges:

Monsieur le Professeur BLOCH
Professeur de Toxicologie

Mademoiselle BESSON
Maître de Conférences de
Pharmacodynamie,

Hommage respectueux et
reconnaisant.

- T A B L E D E S M A T I E R E S -

	Pages:
AVANT-PROPOS	I
INTRODUCTION	1
 <u>CHAPITRE I:</u>	
RAPPEL DES PRINCIPALES PROPRIETES DE LA CREATININE	5
1. Propriétés physiques	5
2. Propriétés chimiques	5
3. Equilibre créatine $\longrightarrow$ créatinine	7
4. Réactions d'identité	8
 <u>CHAPITRE II:</u>	
LA CREATININE DANS L'URINE ET DANS LE SANG	10
1. Identification de la créatinine dans le sang	10
2. Généralités sur le dosage de la créatinine	11
3. Le problème de la défécation	13
 <u>CHAPITRE III:</u>	
ETUDE CRITIQUE DES METHODES DE DOSAGE BASEES SUR LA REACTION DE JAFFE	16
I. Les techniques de FOLIN	16
A. Validité de la comparaison avec la solution de bichromate préconisée dans le cas de l'urine	17
B. Non proportionnalité des colorations aux concentrations. Choix de la longueur d'onde	17
C. Influence du temps et du pH.	25
D. Influence de la température	28
E. Pureté et conservation des réactifs	29
F. Spécificité de la réaction de JAFFE.	30
G. Elimination des chromogènes	35
H. Mécanisme de la réaction de JAFFE. Nature du corps responsable de la coloration.	35
2. La méthode enzymatique de MILLER et DUBOS	37
3. Le dosage de la créatinine par la méthode de l'adsorption-élution	39
4. Caractérisation et dosage des corps créati- niques à l'aide de la chromatographie sur papier.	44

CHAPITRE IV:

METHODES DE DOSAGE BASEES SUR UNE AUTRE REACTION QUE LA REACTION DE JAFFE.	45
1. Méthode au dinitrobenzoate	45
2. Méthodes basées sur la formation d'un com- plexe mercurique	47
3. Essai de mise au point d'une méthode de dosage de la créatinine par le ferricyanure en milieu alcalin	48

CHAPITRE V:

APPLICATION DES PROPRIETES ADSORBANTES DE LA MONTMORILLONITE AU DOSAGE DE LA CREATININE	56
1. Généralités sur la montmorillonite	56
2. Mécanisme de la fixation de la créatinine sur l'adsorbant	59
3. Expériences justifiant l'emploi de la mont- morillonite dans le dosage de la créatinine. Applications en clinique	60
A. Réactifs et méthode de dosage employés	60
B. Fixation de la créatinine sur la mont- morillonite en fonction du pH	62
C. Elution de la créatinine fixée par des solutions d'alcalinité croissante	66
D. Etude comparative entre la méthode classique de FOLIN et les techniques par adsorption	68
E. Epreuves de clearance de la créatinine endogène	71
F. Adsorption et chromogènes non-créatini- niques. Valeur des adsorbants montmoril- lonitiques	73
a. Cas du glucose	74
b. Cas de l'acétone	75
Application: sang et urine de diabé- tique	77
c. Cas de l'acide pyruvique	78
Application: créatinine et hyper- pyruvicémie	80

d. Acide ascorbique et réaction de JAFFE	81
e. L'acide lévulinique en tant que chromogène. Influence de la médication salicylée sur le dosage de la créatinine totale	85
f. Influence de l'albumine urinaire	88
g. Créatinine et azotémie	89
CONCLUSIONS GENERALES	92
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	96

" Ce que l'on sait, souffre
de ce qu'on ne sait pas ".

BRETONNEAU.

- A V A N T P R O P O S -

=====

Le sujet du travail que je présente ici m'a été suggéré par Monsieur le Doyen KAYSER, dont la belle monographie sur les corps créatiniques, parue en 1934, avait constitué une utile mise au point des recherches entreprises sur ce sujet. C'est pourquoi j'ai été particulièrement sensible à l'honneur que m'a fait mon Maître, lorsqu'il m'a proposé de mettre à jour nos connaissances sur le dosage de la créatinine et, si possible, d'y apporter une contribution expérimentale. Je tiens à rendre ici hommage à mon Maître, à sa haute compétence scientifique que j'ai pu apprécier tant à l'amphithéâtre qu'au laboratoire; à son esprit critique toujours en éveil pour donner aux raisonnements et aux expériences la rigueur nécessaire. Je suis heureux de pouvoir lui adresser mes très sincères remerciements pour la profonde et amicale bienveillance qu'il m'a toujours témoignée. Il a su créer ainsi l'ambiance favorable à la recherche scientifique basée sur une collaboration affectueuse entre le Maître et l'Elève.

C'est avec grand plaisir que je remercie Monsieur le Professeur BLOCH pour l'intérêt bienveillant qu'il n'a cessé de porter à mon travail. Ses vastes connaissances dans le domaine complexe de la physico-chimie des argiles

lui ont permis de me prodiguer de précieux conseils enrobés de cette chaleureuse sympathie qui lui est propre.

Mademoiselle BESSON, Maître de Conférences, m'a toujours réservé un accueil des plus cordiaux dans son laboratoire, et je lui en témoigne ici ma vive reconnaissance. J'ai reçu d'elle un enseignement riche et pratique que j'ai pu mettre grandement à profit dans ce travail dont elle a suivi avec intérêt la réalisation.

Ma gratitude va également à Monsieur MIRJOLET, Chef de Travaux, qui m'a toujours bien reçu au laboratoire de Pharmacie Chimique que je n'ai jamais quitté sans avoir obtenu un conseil judicieux ou un encouragement sincère.

Je m'en voudrais d'oublier mes camarades du laboratoire de Chimie dont j'ai partagé les joies et les peines et qui, aux heures difficiles, m'ont encouragé à persévérer.

- I N T R O D U C T I O N -
=====

Le dosage de la créatinine dans les liquides biologiques a fait l'objet d'un grand nombre de travaux; les techniques proposées par FOLIN (34, 35, 36) au début de ce siècle avaient paru satisfaisantes aussi longtemps que physiologistes et cliniciens n'avaient pas attaché au dosage de la créatinine une valeur bien particulière; par la suite il fallut vérifier, si les dosages proposés étaient vraiment corrects, apporter des modifications aux techniques, voire créer des techniques nouvelles, plus sensibles ou plus spécifiques que celles précédemment décrites. Les études analytiques sont nombreuses, leurs conclusions sont parfois discordantes; aussi avons-nous pensé qu'il ne serait pas inutile de faire une revue critique de la question et d'apporter, si nous le pouvions, quelques données nouvelles.

Le dosage classique de FOLIN a été indiqué pour l'urine en 1904. Il est basé sur l'emploi de la réaction que JAFFE (67) avait donnée en 1886 pour caractériser un corps, la créatinine, que LIEBIG avait isolée de l'urine et identifiée, en 1847, montrant sa proche parenté avec la créatine extraite de la viande par CHEVREUL dès 1832.

En dehors de la réaction de JAFFE, peu de propriétés de la créatinine ont pu être utilisées pour en tenter le dosage; signalons toutefois la méthode au dinitrobenzoate, celles par formation d'un complexe mercurique et celle par réduction du ferricyanure alcalin que nous avons essayé de mettre au point.

Pourquoi un dosage correct de la créatinine revêt-il tant d'importance? C'est que la détermination de la créatininémie et de la créatininurie s'est révélée intéressante pour l'exploration fonctionnelle du rein, oeuvre à laquelle restent attachés les noms de REHBERG, GOVAERTS, RABINOWICH, VAN SLYKE et SMITH à l'étranger, AMBARD, HAMBURGER, PAGET et LANGERON en France. Ce sont, entre autres, les dosages de créatinine, effectués par REHBERG (94) sur le liquide glomérulaire, qui ont élucidé le mécanisme de l'élaboration de l'urine; les dosages ont pu être pratiqués sur $1/2 \text{ mm}^3$ de liquide glomérulaire grâce à la méthode de FOLIN transformée en ultramicrométhode, ce qui a permis d'établir les notions modernes sur la physiologie du glomérule de Malpighi.

En 1926, REHBERG (94), qui pense que la mesure de l'excrétion de la créatinine peut servir à évaluer le taux de filtration glomérulaire, propose l'épreuve qui porte son nom, mais dont l'intérêt n'est plus qu'historique. Elle consiste à mesurer la clearance(x) de la créatinine après ingestion de quelques grammes de cette substance. En France, l'épreuve de REHBERG a été étudiée par l'école lilloise de LANGERON, PAGET et NOLF.

Cette épreuve repose sur des idées inexactes. Car au point de vue élimination par le rein, il faut distinguer entre la créatinine "exogène", introduite dans l'organisme en nature ou avec les aliments (viande), et la créatinine "endogène", préexistant dans le plasma. Dans certaines espèces animales (grenouille, lapin, chien...), la créatinine exogène est excrétée par simple filtration; sa clearance est donc égale à celle des corps qui comme l'inuline (SMITH et coll.), le mannitol (HAMBURGER et coll.) et l'hyposulfite (PAGET, LANGERON et leurs élèves), servent à mesurer la filtration glomérulaire.

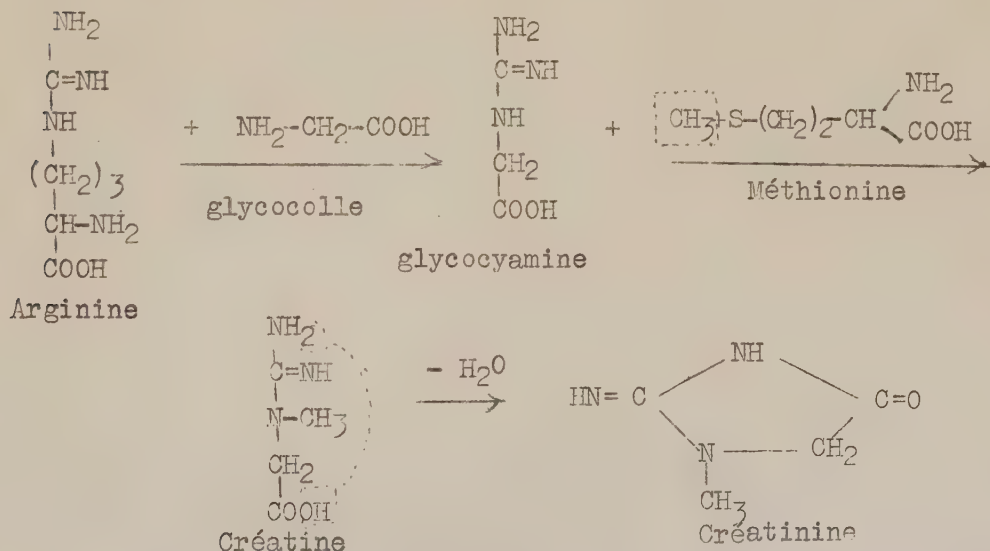
Chez l'homme et les singes anthropoïdes, la créatinine exogène est en partie excrétée par les tubules rénaux, ce qui la rapproche du diodrast, de l'acide para-amino-hippurique et de la phénolsulfonephtaléine, substances dont la clearance est supérieure à la seule filtration glomérulaire. Or, REHBERG avait choisi la créatinine pour étudier le mode de fonctionnement du rein, parce qu'il interprétait toutes les éliminations rénales par un processus de filtration-réabsorption, les phénomènes d'excrétion tubulaire étant à l'époque d'existence douteuse.

La créatinine endogène, chez l'homme normal, semble être uniquement ultrafiltrée au niveau du glomérule. En cas de maladie rénale accompagnée d'une élévation du taux plasmatique de la créatinine (néphrite, par exemple), il viendrait s'ajouter à la filtration glomérulaire une excrétion tubulaire, puisque la clearance de la créatinine devient supérieure à celle de l'inuline. On comprend, dès lors, les réserves faites au sujet de la valeur de la clearance de la créatinine endogène pour déterminer le taux de filtration glomérulaire. Comme le remarque PAGET (88), une prise de position définitive n'est pas possible à l'heure actuelle, et le classement de la créatinine quant à sa clearance (glomérulaire ou mixte) est momentanément réservé.

(x) La clearance représente le volume de plasma sanguin que le rein débarrasse d'une substance donnée en un temps donné.

Dans un autre domaine de la physiopathologie humaine, les dosages de créatinine peuvent encore fournir des renseignements utiles au clinicien. Citons le test de THORN pour l'exploration des fonctions de l'axe hypothalamo-pituito-surrénal comportant, entre autres, la détermination du rapport acide urique/créatinine dans l'urine; la détermination du rapport créatinine/créatine dans l'urine, qui sert en physiologie et en clinique (caractérisation des néphrites et des myopathies). Par ailleurs, l'importance de l'acide créatine-phosphorique ou phosphagène dans le fonctionnement musculaire, contribue aussi à attirer l'attention des chercheurs sur le rôle biologique des corps créatiniques.

Au sujet de la biosynthèse de la créatine et de la créatinine, longtemps restée obscure, l'école américaine de BLOCH, SCHÖNHEIMER et RITTENBERG ainsi que celle de DU VIGNEAUD et coll. ont apporté de vives lumières. A la suite de leurs brillantes recherches, qui ont été continuées et complétées par celles de BORSOOK et DUBNOFF, se trouve établi que la créatinine se forme dans le muscle même, à partir de la créatine, et que celle-ci provient de la méthylation de la glycocyamine, aux dépens de la méthionine dans le foie; la glycocyamine elle-même prend naissance dans le rein par combinaison de l'arginine avec le glyocolle. Le schéma suivant (99) résume les différentes étapes de la biosynthèse des corps créatiniques:



D'après ce qui précède, on conçoit la nécessité de disposer de méthodes fidèles de dosage et aussi d'une méthode de référence; en effet, si l'accord n'a pu être réalisé sur la valeur de la clearance de la créatinine, c'est la diversité, parfois déconcertante, des moyens analytiques mis en oeuvre qui en est en grande partie

responsable.

D'un autre côté, malgré les progrès réalisés et les connaissances amassées, certains points restent à éclaircir: les causes de la constance relative de la créatininurie quotidienne, l'origine de la créatinurie chez l'enfant et la femme enceinte, les relations entre l'avitaminose E et le métabolisme de la créatine et, d'une manière plus générale, les influences hormonales qui président au métabolisme de la créatine et de la créatinine. Il y a encore bien de l'inconnu qui subsiste sur l'identité des corps appelés "chromogènes", parce qu'ils donnent dans les conditions de la réaction de JAFFE la même coloration que celle donnée par la créatinine.

X
X X

A la suite des monographies de HUNTER (1928, 64), de KAYSER (1934, 69,70), de VAGUE et DUNAN (1939, 110), et de BEARD (1943, 9), qui jalonnent les travaux de ces cinquante dernières années sur les corps créatiniques, nous nous efforcerons de donner au lecteur une idée sur les récents développements dans le domaine des dosages de la créatinine en mettant l'accent principalement sur les travaux accomplis depuis la deuxième guerre mondiale. Nous nous limiterons cependant à l'étude critique des dosages de la créatinine dans le sang et dans l'urine en essayant de faire ressortir les travaux qui tendent à augmenter la sensibilité et la spécificité de la réaction de JAFFE, base de la méthode que nous avons mise au point, après avoir vainement tenté de développer une méthode de dosage faisant appel aux propriétés réductrices de la créatinine.

o
o o

Addendum: Au moment de la correction des épreuves de notre travail, nous prenons connaissance de l'article de LANGERON et coll. (75 bis). A côté d'une critique pertinente mais brève des méthodes de dosage de la créatinine, les auteurs proposent une théorie de l'excrétion de cette substance, où 3 mécanismes interféreraient: ultrafiltration glomérulaire, sécrétion et réabsorption tubulaires.

- C H A P I T R E I - =====

RAPPEL DES PRINCIPALES PROPRIETES DE LA CREATININE.

I.- PROPRIETES PHYSIQUES:

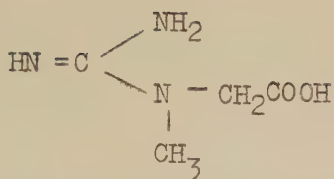
La créatinine est une substance qui cristallise dans le système monoclinique. Si on soumet à l'évaporation spontanée des solutions froides, les cristaux de créatinine se présentent sous forme de tables efflorescentes retenant 2 molécules d'eau de cristallisation. Mais le plus souvent on fait évaporer des solutions chaudes qui donnent alors des cristaux anhydres et de forme prismatique, rectangulaire ou carrée qui se décomposent sans fondre vers 260°.

La créatinine est soluble dans l'eau dans la proportion de 1 partie dans 11,5 parties d'eau à 16°, soit 8,7 pour 100; cette solubilité est de beaucoup supérieure à celle de la créatine qui n'est que de 1 pour 100 environ. La créatinine est également plus soluble que la créatine dans l'alcool et dans l'ammoniaque, ce qui a été mis à profit pour séparer ces deux corps dans leurs mélanges.

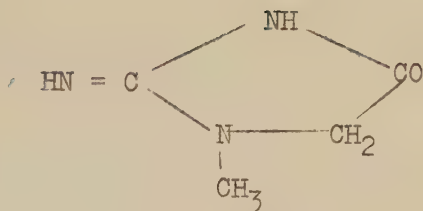
La créatinine est adsorbable par des silicates: kaolin, réactif de LLOYD (silicate d'aluminium hydraté), montmorillonite en milieu acide. La créatine est généralement réputée n'être pas adsorbée dans ces conditions. Mais au cours d'expériences personnelles sur la fixation de la créatine en milieu neutre et acide, nous avons constaté que dans ce dernier cas il y avait adsorption d'une quantité non négligeable de créatine sur le réactif de LLOYD et les argiles montmorillonitiques. La permutite n'adsorbe de leurs solutions ni la créatine ni la créatinine.

2.- PROPRIETES CHIMIQUES :

D'après les formules d'ERLENMEYER (1868), on voit que la créatinine est l'anhydride interne de la créatine et qu'elle s'apparente aux corps à noyau imidazole telles



Créatine



Créatinine

les bases puriques et l'histidine. La créatinine est nettement basique, tandis que la créatine ne l'est que faiblement.

A côté de l'hydrolyse chimique qui, en milieu alcalin, aboutit à la formation de sarcosine et d'urée (pouvant encore se décomposer en ammoniac et gaz carbonique), ou bien de méthylhydantoïne et d'ammoniac, il faut signaler l'hydrolyse sous l'influence d'enzymes bactériens. DUBOS et MILLER (31) ont montré que les réactions chimiques impliquées dans la dégradation de la créatinine par un enzyme d'adaptation, appelé enzyme NC, pouvaient se réduire au schéma suivant:

1 molécule de créatinine donne naissance à 1 molécule d'urée avec comme intermédiaire probable, la méthylguanidine, le sort de la partie restante de la molécule n'ayant pas été entièrement élucidé. En 1950, ROCHE, LACOMBE et GIRARD (95), étudiant la spécificité de certaines déguanidases bactériennes, établissent que le microorganisme *Pseudomonas ovalis* dédouble en milieu aérobie la créatinine, comme la créatine et la glycocyamine, avec formation d'1 molécule d'urée par molécule de substrat décomposé; l'ammoniac se forme lentement, sans doute aux dépens de la sarcosine. Cependant le mécanisme de la formation de l'urée reste mal défini.

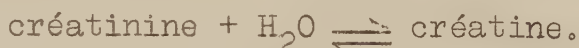
Si on oxyde à chaud créatinine et créatine, il y a principalement formation de méthylguanidine et d'acides oxalique, formique ou carbonique; les bases créatiniques réduisent à chaud le ferricyanure, le bleu de méthylène, l'oxyde de mercure, les solutions cuproalcalines mais pas le réactif de Nylander.

Les corps créatiniques ne gênent pas le titrage des acides aminés par la méthode de Sørensen, car ils ne sont pas attaqués par le formol. L'acide nitreux libère 1 atome d'azote de la créatinine; l'azote de la créatine n'est libéré partiellement qu'en présence d'acide chlorhydrique. Sous l'influence de l'hypobromite une petite quantité de l'azote de la créatinine est libérée, tandis que l'azote de la créatine est libéré totalement.

Avec le chlorure de zinc, la créatinine forme facilement des cristaux complexes de créatinine-chlorure de zinc relativement stables et dont on peut régénérer de la créatinine purifiée.

3.- EQUILIBRE CREATINE $\rightleftharpoons$ CREATININE :

Comme la créatinine dérive de la créatine par perte d'une molécule d'eau aux dépens du carboxyle et du groupement aminé, on conçoit la facilité avec laquelle les deux substances se transforment l'une dans l'autre suivant la réaction d'équilibre:



L'ébullition en milieu alcalin ou simplement aqueux provoque la transformation de la créatinine en créatine; cette réaction se produit déjà à froid, bien que lentement. La réaction inverse a lieu en milieu acide, ceci du fait que la créatinine est une base plus forte que la créatine.

La transformation de la créatine en créatinine par chauffage en milieu acide est utilisée pour doser la créatine sanguine et urinaire; la créatinine totale ainsi formée est dosée par une méthode appropriée. La différence entre la créatinine totale et la créatinine préformée représente la créatine exprimée en créatinine. En multipliant ce résultat par 1,16 (rapport des poids moléculaires des deux bases) on a le poids exact de créatine.

L'équilibre est fonction du pH et de la température. Une étude récente publiée par CLARK et THOMPSON (27) montre qu'à pH 2 en milieu tamponné, après 30 minutes de chauffage à 120°, 98 pour 100 de la créatine présente sont transformés en créatinine.

Une intervention enzymatique est également possible, comme l'ont montré AKAMATSU et KANAI (2) avec la créatinomutase, enzyme d'adaptation trouvé chez des bactéries du sol et capable de modifier la vitesse de la réaction créatinine $\rightleftharpoons$ créatine.

D'un autre côté, SODA, YOSHIDA et OIKAWA (102) ont observé que des cellules de levure de boulangerie sont capables de transformer la créatine en créatinine, transformation couplée avec une oxydation anaérobie du glucose où la participation de la phosphorylation a été mise en évidence.

Les transformations réciproques des corps créatiniques peuvent également avoir lieu dans les milieux biologiques

et dans l'organisme vivant. En effet, on a vu que dans l'urine, même acide, la créatinine se transforme lentement et partiellement en créatine. Il convient cependant de ne pas exagérer l'importance de ce phénomène, car VON FRIJTAG DRABBE et REINHOLD (III), examinant la stabilité de la créatinine dans l'urine additionnée d'éther de pétrole (agent de conservation) à des pH compris entre 6 et 10 grâce à l'addition de carbonate de sodium, n'ont trouvé que des variations insignifiantes du taux de créatinine. Nous-même, conservant des échantillons d'une urine pendant 24 heures à la température de 19° et à des pH compris entre 5 et 9,2, n'avons pas relevé de variations notables de la créatinine. ANKER (5) signale dans cet ordre d'idées que la créatinine reste constante dans une urine additionnée de n-butanol et conservée pendant 16 mois au moins à l'état congelé dans des récipients en polyéthylène. Avec des récipients en verre, cette conservation ne serait que de 3 mois. A + 5°, l'interconversion de la créatine et de la créatinine serait très lente, et les échantillons d'urine se conserveraient facilement 3 mois en présence de toluène ou de n-butanol.

En ce qui concerne le problème intéressant de l'origine de la créatinine urinaire, BORSOOK et DUBNOFF (20) affirment que la vitesse de transformation de la créatine en créatinine dans les tissus est plus grande que dans les solutions pures de créatine. Aucune action enzymatique n'ayant pu être mise en évidence, ces auteurs concluent que la transformation de la créatine, formée dans l'organisme et retenue temporairement sous forme de phosphocréatine, se fait selon toute vraisemblance partout où il y a de la phosphocréatine et plus particulièrement dans les muscles.

Par contre, l'hydratation de la créatinine dans les milieux biologiques n'a jamais été prouvée de façon certaine.

4.- REACTIONS D'IDENTITE:

La réaction la plus importante est celle de JAFFE. En milieu alcalin, l'addition d'une solution saturée d'acide picrique à une solution de créatinine donne une coloration rouge orangée; en présence d'une grande quantité de créatinine la coloration obtenue est rouge vif. Signalons tout de suite le manque de spécificité de cette réaction.

Une solution légèrement alcaline de créatinine, traitée par du nitroprussiate de sodium, prend une teinte rouge qui vire au jaune: c'est la réaction de WEYL. Si on ajoute de l'acide acétique à ce liquide, on obtient après ébullition une coloration verte passant au bleu, par suite de la formation de bleu de Prusse. Cette réaction est due à

SALKOWSKY, On peut utiliser le chlorure ferrique à froid, à la place de l'acide acétique. Comme la première, cette réaction n'est pas spécifique; elle est donnée en particulier par la créatine, l'hydantoïne et les corps cétoniques.

L'addition, à une solution de créatinine, d'acide 3,5-dinitrobenzoïque et de soude provoque une coloration rose pourprée pouvant être utilisée pour le dosage de la créatinine; cette réaction est plus spécifique que la réaction de JAFFE, mais d'application plus délicate.

La créatinine donne avec les solutions diluées de perchlorure de fer une coloration rouge sombre qui fonce encore si l'on chauffe. Ici, comme dans la réaction de JAFFE, intervient l'isomérisation cétonolique de la créatinine.

Récemment, SULLIVAN et IRREVERRE(108) ont indiqué qu'on obtient avec le 1,4-naphtoquinone-2-sulfonate de potassium ajouté à des solutions de créatinine, une coloration rouge en milieu acide, extractible par le chlorure de méthyle.

o
o o

- C H A P I T R E II -

=====

LA CREATININE DANS L'URINE ET DANS LE SANG.

I.- IDENTIFICATION DE LA CREATININE DANS LE SANG:

Il n'est pas sans intérêt de retracer ici les étapes les plus importantes d'un débat qui, en dehors du problème purement technique du dosage de la créatinine, touchait à une question primordiale: celle de la présence ou de l'absence de la créatinine dans le sang humain.

Dès 1917, HUNTER et CAMPBELL (56) avaient montré que la réaction de JAFFE était la même dans le sang et dans une solution pure de créatinine. Mais un an plus tard, GREENWALD et MAC GUIRE (50) mettent en doute l'existence de la créatinine dans le sang. En 1922, BEHRE et BENEDICT (10) essaient en vain d'adsorber sur du kaolin en milieu acide la créatinine du sang. Ils montrent également que la soi-disant créatinine sanguine n'est pas altérée par chauffage en milieu alcalin, alors qu'il devrait se former de la créatine. D'après ces auteurs, il existerait dans le sang un chromogène non-créatininique capable de donner la réaction de JAFFE. En 1928, GAEBLER et KELTCH (44), bien qu'ayant réussi par adsorption sur un précipité de microphosphotungstate de potassium ou sur du réactif de LLOYD à isoler de la créatinine à partir de sang de néphritique, estiment que les défécats sanguins diffèrent des solutions pures de créatinine. En 1930, GAEBLER (45), qui opère sur des ultrafiltrats de sang laqué de chien et d'homme normal, constate que la créatinine qui s'y trouve apparemment, ne se fixe pas sur le kaolin, tandis que de la créatinine pure surajoutée est fixée. Il conclut que le sang contient un chromogène vraisemblablement transformé en créatinine par le rein.

C'est alors qu'ACHARD, LEVY et POTOP (1) démontrent que la créatinine du sang est entièrement ultrafiltrable, donc qu'elle existe bien dans le sang. Dans cet ordre d'idées il convient de mentionner des expériences très récentes (87)

qui font penser que le sérum et le plasma renferment un chromogène non-créatininique qui n'est pas dialysable.

Cependant BENEDICT et BEHRE (12), à la suite des différences de teinte observées avec le 3,5-dinitrobenzoate sur des filtrats tungstomolybdiques et sur des ultrafiltrats de sérum d'une part, et les solutions de créatinine d'autre part, maintiennent leur doute. Entre-temps, HAYMAN, JOHNSON et BENDER (58) avaient trouvé que si on remplace l'acide picrique par l'acide trichloracétique dans la défécation du sérum et du plasma, le filtrat obtenu diffère peu, par ses réactions, de la créatinine pure. Ils admettent donc avec nombre d'autres chercheurs l'existence, dans le sang, de créatinine vraie à côté d'une pseudocréatinine.

L'année 1937 est décisive. ZACHERL (115) isole à partir d'un sérum de veau, déféqué par l'alcool, de la créatinine sous forme de sel basique de mercure qui, après décomposition par l'hydrogène sulfuré, permet d'obtenir du picrate de créatinine. Mais c'est à MILLER et DUBOS (84,85) que revient le mérite d'avoir démontré de façon irréfutable, grâce à des expériences faites avec les enzymes des bactéries NC et HR, que la créatinine existe réellement dans le sang et qu'elle constitue une part importante du matériel chromogène de ce milieu. A ces auteurs il apparaîtrait comme très douteux que les douces manipulations employées dans la préparation des défécats plasmatiques, sériques ou sanguins à l'aide de l'acide tungstique, puissent transformer un précurseur en créatinine. De plus, les mêmes résultats peuvent être obtenus avec les chromogènes du liquide céphalorachidien qui est le type naturel d'un ultrafiltrat. Enfin, MILLER et DUBOS (84) voient dans le fait que 2 réactions colorées (JAFÉ et dinitrobenzoate), dont chacune présente une sensibilité différente aux composés voisins de la créatinine, donnent les mêmes valeurs sur le sang, une preuve supplémentaire de l'identité des substances chromogènes avec la créatinine.

2.- GENERALITES SUR LE DOSAGE DE LA CREATININE:

Le dosage gravimétrique de la créatinine, préconisé en 1863 par NEUBAUER et basé sur l'insolubilité relative du complexe chlorure de zinc- créatinine, n'a plus aujourd'hui qu'un intérêt historique.

La plupart des dosages de créatinine reposent sur la codification, vers une fin quantitative, de la réaction colorée décrite en 1886 par JAFÉ (67). Cette réaction se fait par simple mélange de la liqueur contenant la créatinine avec une solution picratosodique. Elle est donc particuliè-

rement aisée à faire et elle se développe à froid, assez rapidement; les réactifs sont peu coûteux, la réaction est sensible, fidèle et susceptible de colorimétrie, technique fort agréable à pratiquer et qui permet facilement les dosages en série.

Il faut néanmoins déterminer les conditions dans lesquelles la réaction de JAFFE permet de doser toute la créatinine présente et rien qu'elle. Ce dernier point comporte l'étude de la spécificité de la réaction de JAFFE, tandis que le premier oblige, entre autres, à utiliser un mode de défécation dans les liquides biologiques qui n'entraîne pas du tout de créatinine.

Pour atteindre ces 2 buts, il a fallu chercher à perfectionner les techniques qui font appel au réactif picratosodique, ou bien élaborer des techniques basées sur des principes différents et qui donnent davantage satisfaction. L'emploi de la réaction de JAFFE sera étudié en détail dans le chapitre III, les autres méthodes - peu nombreuses - faisant l'objet du chapitre IV.

Signalons dès maintenant que le problème du dosage de la créatinine ne se pose pas de la même façon dans le cas de l'urine et du sang.

L'urine est un liquide dont le résidu sec est relativement peu abondant et qui est généralement dépourvu de protéines et de substances chromogènes autres que la créatinine (86). Nos essais personnels ont d'ailleurs établi que la défécation de l'urine, surtout diluée, n'est pas indispensable (v.p. 88). La teneur en créatinine y est habituellement de 1 g par litre; le volume dont on peut disposer est facilement important, de sorte que la prise d'essai peut contenir plusieurs centigrammes de créatinine; l'appréciation du dixième de milligramme donne déjà une approximation suffisante dans le résultat. Il se trouve d'ailleurs que la réaction de JAFFE est très sensible et qu'elle se prête mieux à la colorimétrie, si le liquide est suffisamment dilué.

Le sang, liquide fortement albumineux, se prête beaucoup moins bien que l'urine au dosage de la créatinine. Le dosage dans les globules de même que dans le sang total est fort sujet à caution; généralement on se contente de doser la créatinine dans le plasma ou le sérum. En effet, à l'aide de leur méthode enzymatique (v.p. 37), MILLER et DUBOS (85) ont pu confirmer la présence dans les hématies de grandes quantités de corps chromogènes non créatininiques, ce qui avait déjà été signalé par HUNTER et CAMPBELL en 1917 (65). Le dosage dans les hématies est d'ailleurs sans signification physiologique. Si par nécessité on doit se servir du sang total, le laquage des hématies est à éviter.

Chez les individus normaux, la créatinine constitue 80 à 100 pour 100 du matériel chromogène du sérum ou du plasma, alors que dans les hématies elle n'est représentée que pour 30 à 50 pour 100. Ce résultat, établi par MILLER et DUBOS (85) a été récemment vérifié par emploi du réactif de LLOYD (53).

Chez les personnes atteintes d'urémie, il y aurait, par contre, beaucoup de chromogènes non-créatininiques, au point qu'il serait possible de voir un parallélisme entre la sévérité de l'atteinte et la quantité absolue de ces substances. De leur côté, HAUGEN et BLEGEN (56) viennent de signaler que la pseudocréatinine, c'est-à-dire l'ensemble des corps JAFFE-positifs autres que la créatinine, augmente d'une façon sensible en cas d'urémie seulement.

Quoi qu'il en soit, la dilution de la créatinine dans le sang est 100 fois plus forte que dans l'urine, de sorte qu'on se trouve d'emblée dans le domaine de validité de la loi de BEER-LAMBERT. Les colorations à mesurer sont cependant faibles et réclament par conséquent l'emploi d'un colorimètre de qualité.

3.- LE PROBLEME DE LA DEFECATION.

Pratiquement toutes les techniques de dosage de la créatinine applicables au sérum ou au plasma, nécessitent une défécation préalable. L'agent défécant et les conditions de la défécation sont importants à étudier, une adsorption de la créatinine sur le précipité de protéines étant à redouter.

La première technique correcte de dosage qui ait été décrite, est due à FOLIN et WU (40); elle comporte une défécation à l'acide tungstique qui donne un filtrat qu'on sature avec de l'acide picrique et qu'on additionne de soude. Plus tard, FOLIN (37) a remplacé l'acide tungstique par le mélange, en quantités sensiblement équivalentes, de tungstate de sodium et d'acide sulfurique en quoi il a été suivi par tous les chercheurs actuels. Suivant ce mode opératoire, 5 à 15 ml de sang oxalaté à 2 pour 100, sont dilués dans 7 volumes d'eau et traités par 1 volume de solution de tungstate de sodium à 10 pour 100 et 1 volume d'acide sulfurique 0.66 n. Le sang se trouve donc dilué 10 fois. De même PETERS (90) pratique la défécation tungstique 1/10, dilution qu'il considère comme particulièrement favorable à la lecture correcte des colorations.

LAUSON (77) préfère la défécation 1/5, mais il ajoute que la concentration en acide tungstique à employer doit tenir compte de la quantité de protéines plasmatiques.

De même, MILLER et MILLER (86) dosent la créatinine dans des filtrats tungstiques I/5

BROD et SIROTA (22) de leur côté, optent pour la dilution I/4; ils remarquent qu'avec l'acide sulfurique 0.66 n on retrouve plus de créatinine surajoutée qu'avec l'acide 0.33 n. KOSTIR et SONKA (73), HAUGEN (54), ainsi qu'OWEN et coll. (87) se rangent du côté de BROD et SIROTA.

ROSCOE (96) pour sa part, tout en adoptant le mélange tungstate + acide sulfurique, se sert de réactifs dont la concentration est moitié moins forte que celle employée habituellement: 5 pour 100 pour la solution de tungstate et 0.33 n pour l'acide sulfurique.

CAMARA et coll. (24) pratiquent également la défécation tungstique, mais trouvent, contrairement aux auteurs précédents, des valeurs beaucoup plus faibles avec les filtrats I/4 qu'avec ceux I/10. Ils expliquent ce phénomène par l'adsorption d'une plus forte quantité de créatinine sur le précipité de protéines qui est plus dense lorsque la dilution est faible. Cette fixation de la créatinine sur les protéines se produirait à un degré moindre dans la défécation I/10; la présence de petites quantités de chromogènes non-créatininiques compenserait ces pertes légères, de sorte qu'il y a une "fortunate combination of errors".

La défécation trichloracétique est moins fréquemment préconisée. HARE (53) emploie l'acide trichloracétique à 20 pour 100 et obtient une dilution I/5. Au contraire, MANDEL et JONES (81), au cours d'une étude critique des différents procédés de déprotéinisation, donnent la préférence à l'acide trichloracétique tel que l'utilise HARE, ceci à cause des bons rendements en créatinine. Il en est de même pour LØKEN (80) qui, vis-à-vis des filtrats tungstiques I/4 trouve aux filtrats obtenus à partir d'acide trichloracétique normal les avantages suivants: meilleur rendement en filtrat, vitesse de filtration beaucoup plus rapide et meilleure élimination des protéines.

La défécation par les hydroxydes métalliques (Zn, Fe, Cd), s'emploie plus rarement, les pertes en créatinine étant relativement importantes, surtout avec les deux premiers hydroxydes.

En ce qui concerne la défécation ferrocyanozincique, des recherches personnelles avec des solutions pures de créatinine, traitées suivant le mode opératoire de PAGET (89) nous ont montré que si la dilution est suffisante, toute la créatinine présente est retenue au sein du précipité de ferrocyanure de zinc.

L'acide picrique, ayant la propriété de précipiter les protéines, a été préconisé comme défécant par divers auteurs; il a l'avantage d'être simultanément défécant et participant à la réaction de JAFFE. POPPER, MANDEL et MAYER (93) ont trouvé des résultats satisfaisants avec la défécation picrique du sérum, tandis que BROD et SIROTA, dans les mêmes conditions, ne retrouvent que 90 pour 100 de la créatinine surajoutée au plasma. Ce résultat est confirmé indirectement par BLEGEN, HAUGEN et AAS (14) pour lesquels la précipitation des protéines par l'acide picrique semble entraîner un peu de matériel chromogène. De plus, la défécation picrique empêche le dosage ultérieur de la créatine par passage à l'autoclave. Néanmoins, la technique de POPPER et coll. continue à être en vogue surtout chez les auteurs allemands et autrichiens qui souvent la placent au même rang que les méthodes spécifiques par emploi d'adsorbants (29, 30, 101).

Nous verrons par la suite que le pH obtenu après la défécation influe considérablement sur le développement de la réaction de JAFFE, ce qui permettra d'expliquer certains résultats contradictoires relevés par nous dans la littérature. Disons dès maintenant que, si on ajoute une même quantité de réactif picratosodique à des défécats présentant des pH différents, le pH final sera différent et la réaction de JAFFE évoluera de façon différente. D'une manière générale, les résultats peuvent être insuffisants soit parce que le coagulum protéique retient de la créatinine, soit parce que, ne tenant pas assez compte du pH du défécant, on exécute la réaction de JAFFE dans des conditions qui ne sont pas satisfaisantes. La défécation tungstique a été très étudiée sous ce rapport comme nous allons le voir au chapitre suivant.

L'avènement de la chromatographie, et plus spécialement de celle qui se fait sur papier, a pu faire penser un moment à la suppression de la défécation, mais rapidement cette technique s'est révélée trop délicate pour réaliser cet espoir. Cependant, elle a permis de montrer de façon irréfutable la présence de créatinine dans le sang, et d'apporter quelques lumières au difficile problème de la nature des chromogènes non-créatininiques. (v.p. 33 et 44).

- C H A P I T R E I I I -
=====

ETUDE CRITIQUE DES METHODES DE DOSAGE BASEES SUR LA
REACTION DE JAFFE.

I.- LES TECHNIQUES DE FOLIN :

a) Dans l'urine.

La technique indiquée par FOLIN en 1904 (34) se pratique ainsi: dans un matras de 500 ml, on mélange 10 ml d'urine, 15 ml d'une solution saturée d'acide picrique et 5 ml de soude à 10 pour 100; après 10 minutes de contact, on complète avec de l'eau à 500 ml et on mélange à nouveau. La coloration rouge orangée est comparée au colorimètre de Duboscq avec celle d'une solution de bichromate de potassium à 24,55 g par litre. Cette solution, vue sous une hauteur de 8 mm, a la même coloration qu'une solution de créatinine à 1 g par litre, traitée comme l'urine et observée sous une hauteur de 8,1 mm. Avec ces données, il est facile de calculer la teneur en créatinine de l'urine analysée.

b) Dans le sang.

La méthode de FOLIN et WU (1919,40), fait doser la créatinine dans le sang total déféqué au dixième par l'acide tungstique en sursaturant des prises d'essai de 15 à 25 ml de filtrat avec de l'acide picrique solide (un gramme environ); on agite pendant 10 minutes et on élimine par filtration l'excès d'acide picrique. Des prélèvements variables de ce liquide sont additionnés d'un vingtième de leur volume de soude à 10 pour 100. La lecture se fait au colorimètre de Duboscq au bout de 10 minutes en comparant avec une solution étalon de créatinine traitée de la même façon par l'acide picrique et la soude. La concentration de l'étalon est à choisir en fonction de la quantité de créatinine que renferme le sang. Ainsi, pour les sangs normaux, l'étalon convenable est à 0,1 mg de créatinine /100 ml.

Nous allons résumer maintenant les principales critiques adressées à la réaction colorée de JAFFE et aux techniques de FOLIN.

A.- VALIDITE DE LA COMPARAISON AVEC LA SOLUTION DE BICHROMATE PRECONISEE DANS LE CAS DE L'URINE.

L'étude spectrophotométrique a montré que la solution qui renferme la créatinine, l'acide picrique, la soude et l'eau, d'une part, et la solution de bichromate de potassium, d'autre part, présentent des spectres notablement différents. Pour les longueurs d'onde comprises entre 4650 et 5100 Å, les divergences sont moins sensibles, ce qui explique l'utilité d'un écran bleu-vert dans les lectures colorimétriques. Cependant, dans les publications des dernières années, l'étalon au bichromate est presque toujours remplacé par des solutions de créatinine.

L'emploi de l'étalon chimique au nitrate cérique, proposé récemment par SOLTI (103), ne s'est pas généralisé.

B.- NON PROPORTIONNALITE DES COLORATIONS AUX CONCENTRATIONS. CHOIX DE LA LONGUEUR D'ONDE.

FOLIN lui-même s'était aperçu que le rapport des colorations aux quantités de créatinine ne suivait pas une relation linéaire. En règle générale, on peut dire que la loi de BEER-LAMBERT ne se vérifie jamais sur une échelle bien longue dans les dosages colorimétriques. Au sujet de la créatinine, les auteurs sont unanimes à recommander une grande prudence dans l'application de cette loi.

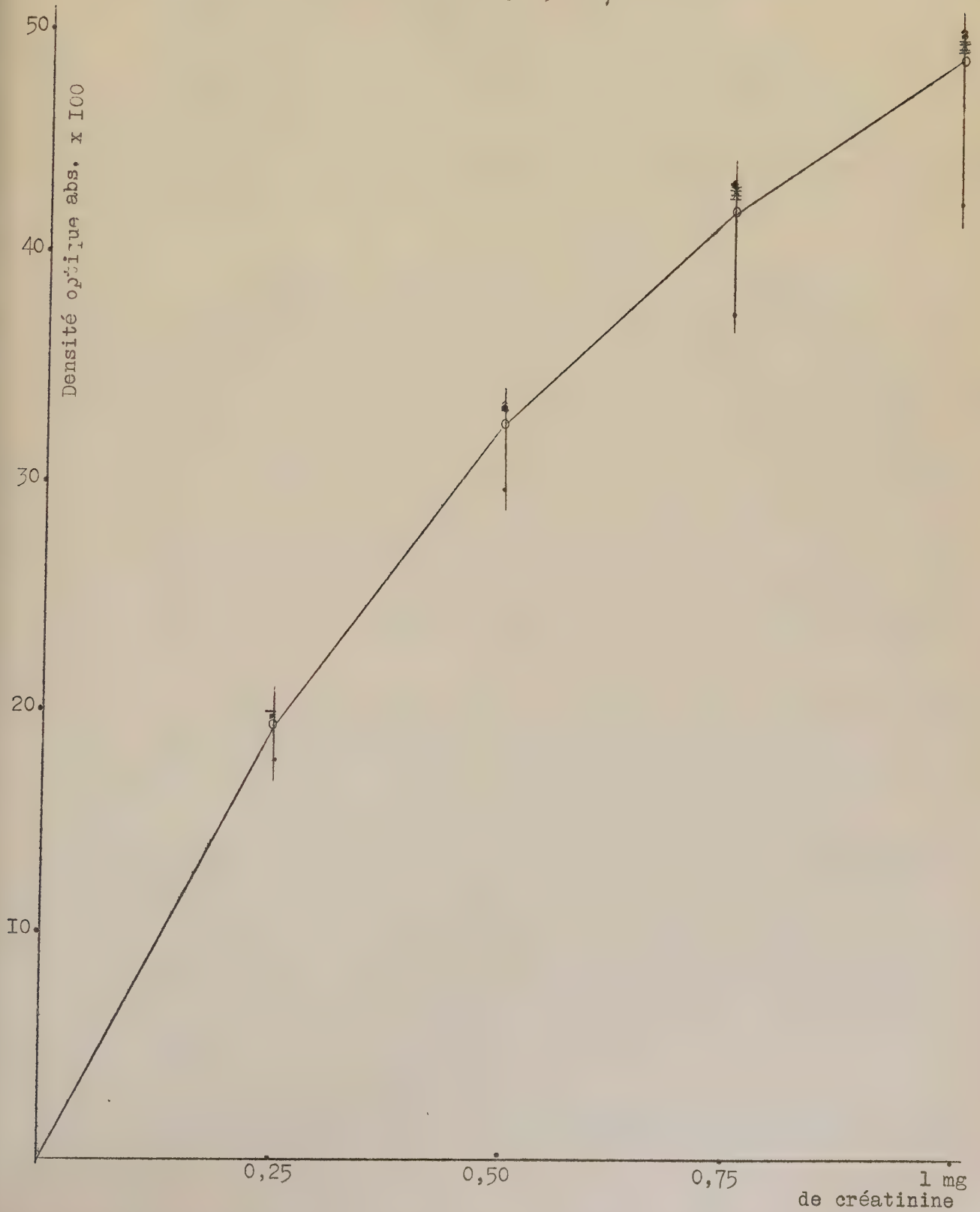
KAYSER (69), opérant sur des urines plus ou moins diluées comme sur des solutions de créatinine à divers titres, n'a jamais observé de proportionnalité rigoureuse entre colorations et concentrations, même lorsque celles-ci ne diffèrent pas de plus de 10 pour 100 d'un échantillon au suivant. D'après lui, certains auteurs qui prétendaient avoir observé une proportionnalité complète, avaient répété dans la préparation de leurs étalons une erreur systématique de calcul qui rend suspectes leurs vérifications. D'ailleurs, KAYSER, en appliquant la technique de CAHN, HOUGET et JACQUOT (23) à l'urine, a eu le mérite d'avoir été parmi les premiers à préconiser une dilution de l'urine et de rendre ainsi plus sensible et plus correct le dosage de la créatinine dans ce milieu.

GRAPHIQUE N° I

METHODE DE FOLIN (URINE)

5 mesures effectuées au cours d'une période de 2 mois.

Photocolorimètre Coleman Junior; $\lambda = 520 \text{ m}\mu$.



L'accord n'est pas toujours réalisé au sujet des concentrations auxquelles se vérifie la loi de BEER-LAMBERT. Aux concentrations relativement élevées cette loi n'est plus valable, tous les chercheurs sont d'accord sur ce point. SALVIAT (98), par exemple, se limite aux concentrations inférieures à 100 mg pour 100 dans l'urine pour y doser la créatinine selon une technique de FOLIN légèrement modifiée; dans nos propres dosages de créatinine urinaire selon FOLIN, la loi de BEER-LAMBERT n'est pas satisfaite (graphique n° 1), mais en dépit de ce grave défaut, cette méthode est suffisamment précise pour les déterminations courantes de créatinine dans l'urine, milieu où les petites variations de la teneur en créatinine n'ont que peu d'importance.

BORSOOK (19) observe une relation linéaire entre l'absorption et la concentration en créatinine de 0 à 2 mg/100 ml (prise d'essai = 2 ml). POPPER et coll. (93) estiment que les concentrations à réaliser les plus favorables pour le sang et pour l'urine s'échelonnent entre 0,5 et 2 mg pour 100. PETERS (90) les étend à celles comprises entre 1 et 5 mg pour 100, LØKEN (80) croit pouvoir aller jusqu'à 4 mg pour 100, tandis qu'ALBANESE et WANGERIN (3), travaillant sur l'urine uniquement, les limitent à 0,5 - 3 mg pour 100; BARAC et DELVENNE (6) de leur côté recommandent 0,25 à 1,38 mg/100 ml (prise d'essai = 10 ml). KOSTIR et SONKA (73) trouvent que la loi de BEER-LAMBERT est parfaitement vérifiée dans le domaine qu'ils explorent, mais les concentrations étudiées par eux sont faibles; leurs courbes d'étalonnage ne vont que jusqu'à 2 mg/100 ml (prise d'essai = 6 ml).

Au cours des dosages que nous avons effectués avec la méthode de FOLIN et WU sur le sérum, nous avons pu vérifier une proportionnalité satisfaisante jusqu'à 0,6 mg/100 ml (prise d'essai = 20 ml; graphique n° 2).

HERVEY (62) suivant la technique de BONSNES et TAUSSKY (18), obtient une droite. En effet, BONSNES et TAUSSKY sont plus sévères sur ce point et ne trouvent une relation linéaire que pour les concentrations inférieures à 0,3 mg/100 ml (prise d'essai = 3 ml) en effectuant les lectures en lumière monochromatique à la longueur d'onde de 525 m μ . Ils pensent d'ailleurs que la sensibilité peut diminuer aux dilutions aussi fortes et la meilleure application de la loi de BEER-LAMBERT serait alors plus apparente que réelle.

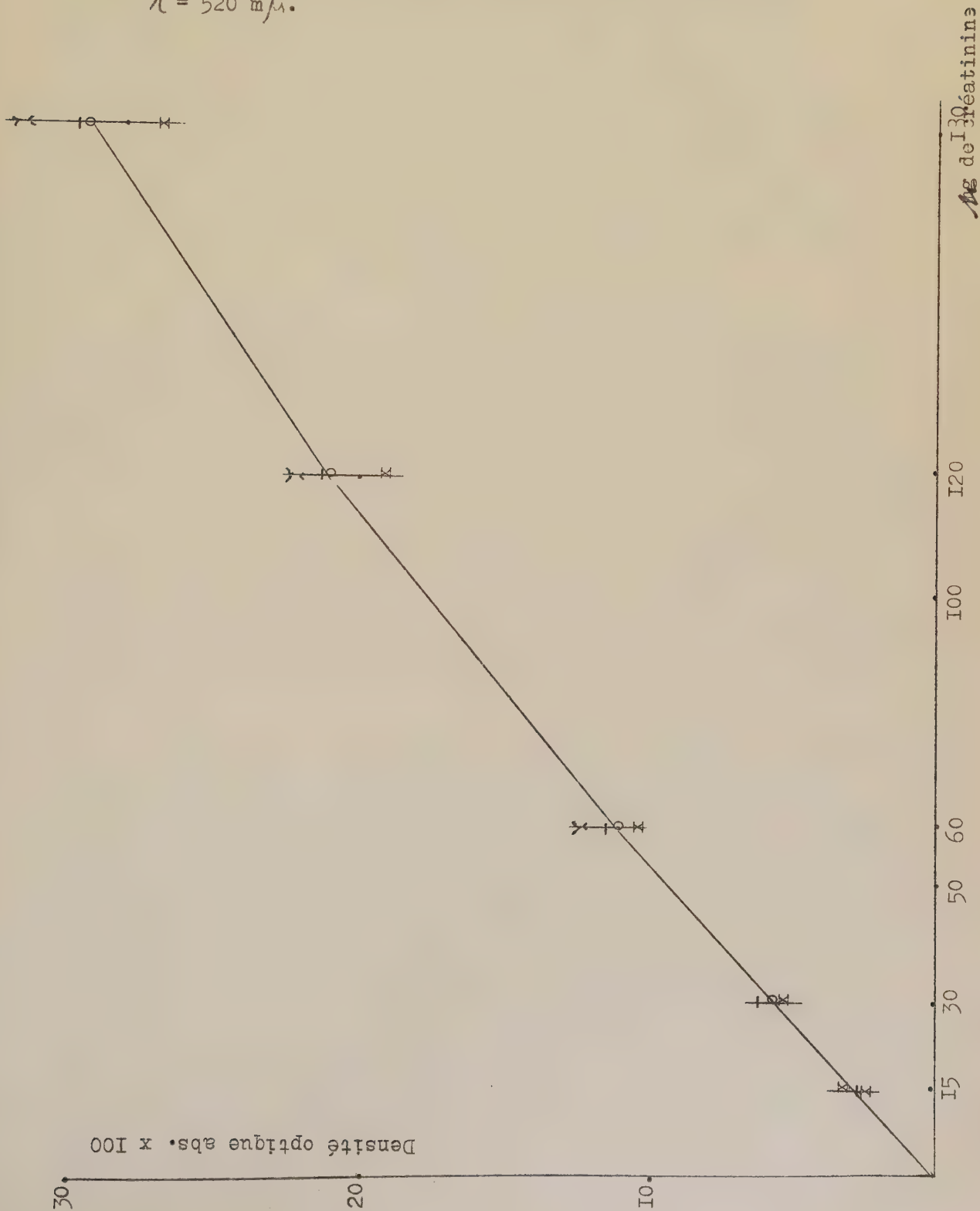
On peut se demander pourquoi, dans le cas de la créatinine, cette loi n'est vérifiée que dans un domaine

GRAPHIQUE N° 2.

METHODE DE FOLIN ET WU (SERUM)

6 mesures effectuées au cours d'une période de 1 mois.

$\lambda = 520 \text{ m}\mu$.



aussi limité. PETERS (90) propose de l'expliquer par le caractère "bicolore" du liquide soumis à la colorimétrie, la coloration due au réactif picratosodique s'atténuant lorsque celle due au picrate de créatinine augmente. CLARK et THOMPSON (27) accusent le pouvoir sélectif insuffisant des filtres dans les colorimètres surtout que la solution de picrate alcalin présente un maximum d'absorption très voisin de celui de la coloration de JAFFE. Ceci n'exclut pas une explication basée sur le mécanisme chimique de la réaction de JAFFE en admettant que, suivant la concentration en créatinine, des combinaisons colorées différentes se forment, 1 molécule de créatinine pouvant se combiner à 2, 3 ou 4 molécules de soude en même temps qu'à 1 molécule d'acide picrique (v. p.37).

Théoriquement, comme l'a rappelé HERVEY (62), la loi de BEER-LAMBERT ne peut s'appliquer qu'en lumière monochromatique. Nous venons de voir que BONSNES et TAUSSKY ont choisi 525 m μ ; c'est, en effet, aux environs de 525m μ que les auteurs qui ont étudié systématiquement le spectre de la coloration de JAFFE, s'accordent pour faire les lectures. GARNER (45) propose 515 m μ ; HERVEY signale que si on augmente la longueur d'onde, la sensibilité diminue et vice-versa, mais ceci ne vaudrait que pour une petite partie du spectre. Voilà pourquoi il recommande 520 m μ comme la longueur d'onde qui convient le mieux. 480 m μ et 490 m μ , bien que déconseillés par GARNER, seraient également satisfaisants, mais l'intervalle des concentrations de créatinine pour lesquelles la loi de BEER-LAMBERT s'applique, est deux fois moindre que lorsqu'on opère à 520 m μ .

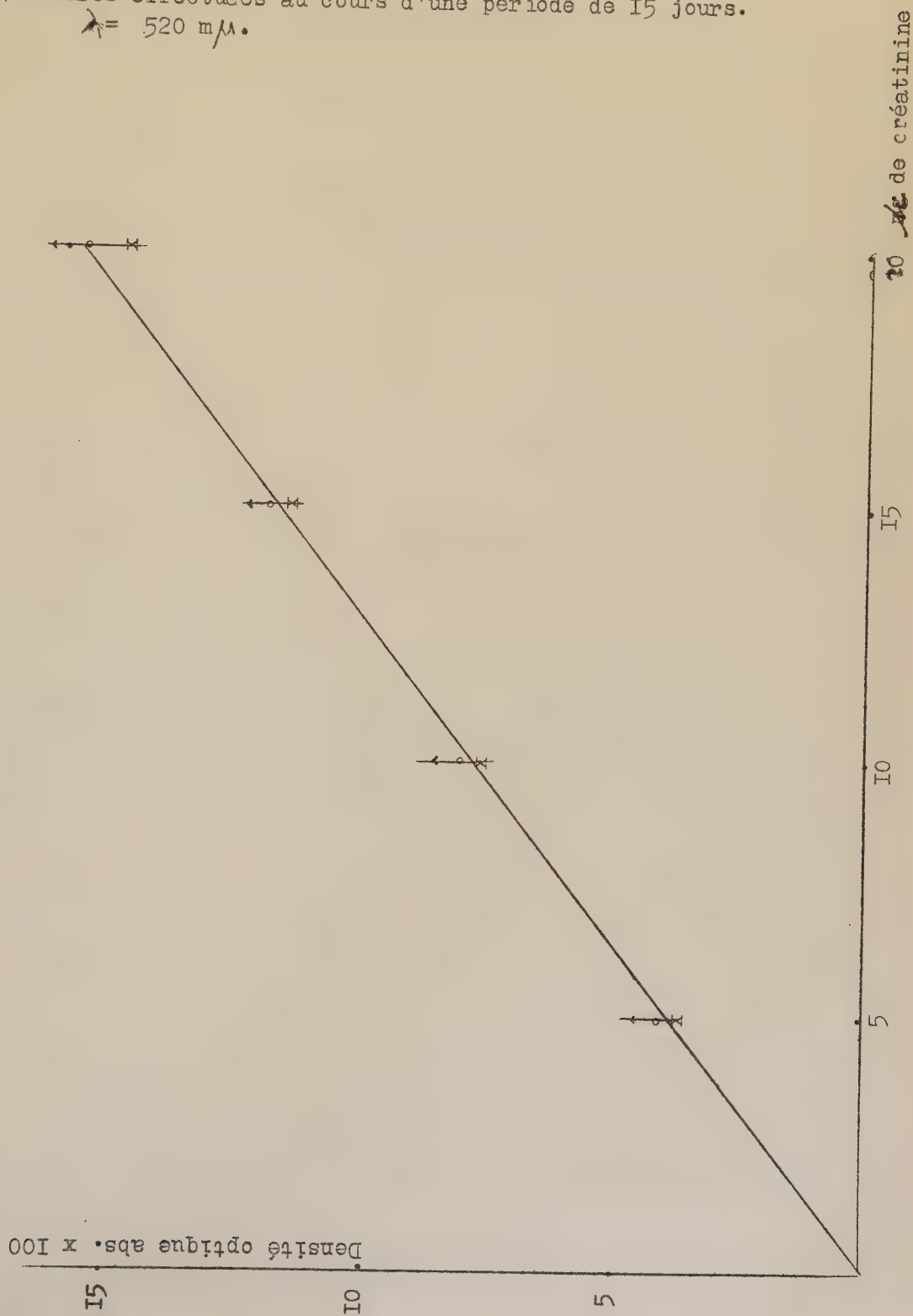
C'est pour des raisons analogues qu'OWEN et coll. (87) recommandent une longueur d'onde supérieure à 500 m μ . Entre 480 et 520 m μ ils notent que la relation densité optique - concentration devient de plus en plus linéaire à mesure que la longueur d'onde augmente, ceci jusqu'à une certaine valeur à partir de laquelle la densité optique diminue quand la longueur d'onde continue d'augmenter. A 520 m μ , la relation est linéaire jusqu'à 0,4 mg de créatinine/100 ml (prise d'essai = 5 ml), résultat que nous pouvons confirmer à la suite d'essais personnels pratiqués dans les mêmes conditions (graphiques n° 3, 4 et 5); avec 0,8 mg/100 ml l'écart n'est que de 2 pour cent. Ils choisissent alors 520 m μ pour faire leurs lectures. Enfin, ANKER (5) obtient le maximum de densité optique pour les solutions de picrate de créatinine à 500 m μ , et il ne vérifie la loi de BEER-LAMBERT que jusqu'à 0,035 mg/100 ml (prise d'essai = 1 ml).

GRAPHIQUE N° 3.

DOSAGE APRES ADSORPTION SUR TERRE DE TAOURIRT ACIDIFIEE

4 mesures effectuées au cours d'une période de 15 jours.

$\lambda = 520 \text{ m}\mu$.

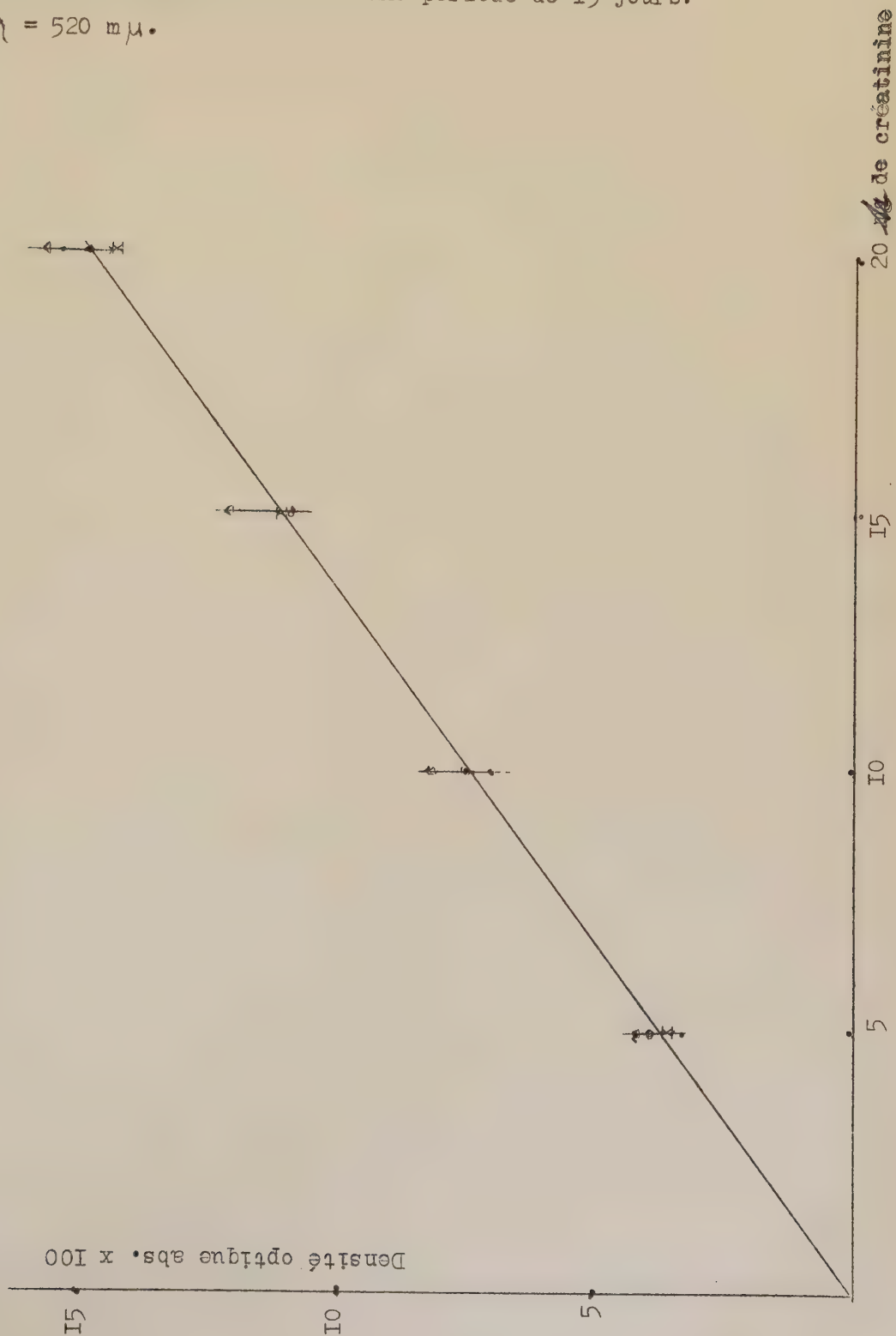


GRAPHIQUE N° 4.

DOSAGE APRES ADSORPTION SUR BENTONITE PROLABO ACIDIFIEE.

4 mesures effectuées au cours d'une période de 15 jours.

$\lambda = 520 \text{ m}\mu.$

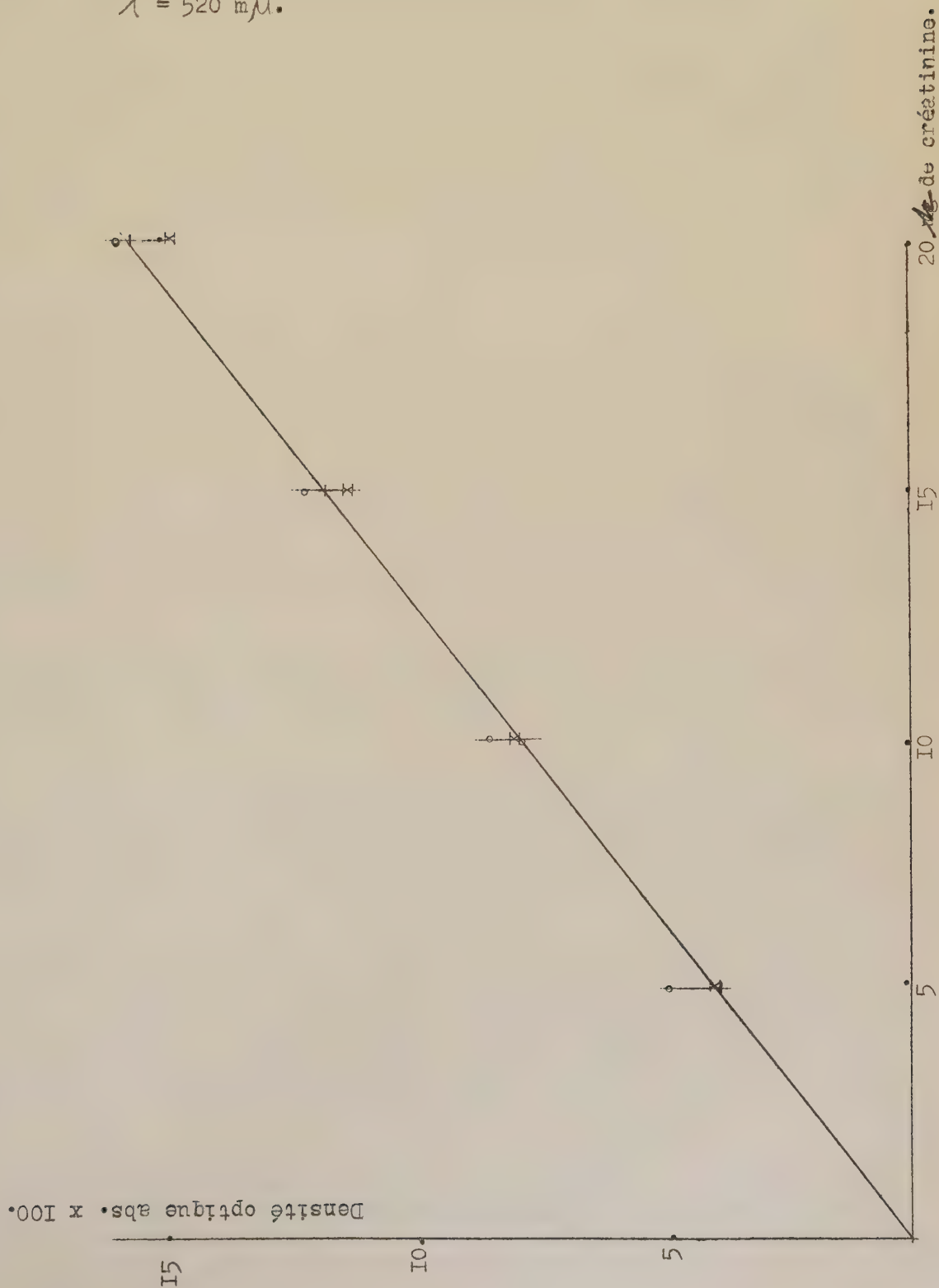


GRAPHIQUE N° 5.

DOSAGE APRES ADSORPTION SUR REACTIF DE LLOYD.

4 mesures effectuées au cours d'une période de 15 jours.

$$\lambda = 520 \text{ m}\mu.$$



En résumé, on voit que la loi de BEER-LAMBERT est respectée d'une façon satisfaisante pour les faibles concentrations (généralement inférieures à 1 mg pour 100) et dans des intervalles qui varient avec les conditions du dosage. Il est superflu d'insister que seuls de bons colorimètres peuvent donner des résultats corrects et reproductibles dans certaines limites, car les courbes d'étalonnage, tracées à des intervalles qui vont de quelques jours à plusieurs semaines, ne sont pas superposables; il faut donc les refaire pour chaque série de dosages, nécessité reconnue par tous les chercheurs actuels et qui s'explique en partie par les variations de la tension du courant qui alimente le photomètre, et en partie par le vieillissement des réactifs employés, dont le degré de saturation (acide picrique) mérite également des précautions spéciales (graphiques n° I - 5 et aussi p.29).

C.- INFLUENCE DU TEMPS ET DU pH :

Le rôle du temps au bout duquel sont effectuées les lectures colorimétriques, est diversement apprécié. 10 minutes de contact avec le réactif picrique avant la lecture semblent suffisantes à FOLIN pour le dosage dans l'urine et dans le sang. D'autres auteurs préconisent des temps d'attente supérieurs pouvant aller jusqu'à 1 heure. Plus spécialement, il faut distinguer ici entre l'urine, qui se comporte sensiblement comme une solution pure de créatinine, et le sang, où la présence de chromogènes non-créatininiques, en quantités variables, influe plus ou moins fortement.

BLAIZOT (13) revient à la technique de CAHN, HOUGET et JACQUOT adaptée à l'urine par KAYSER (69), qui prévoit un éclairage uniforme pendant le temps de développement fixé à 1 heure.

LAMBERT (75), dans son adaptation au colorimètre photoélectrique de la méthode de FOLIN pour l'urine, dilue le mélange réactionnel 6 minutes après l'addition des réactifs et lit 20 minutes après cette dilution, la stabilité étant de quelques heures.

BARAC et DELVENNE (6) affirment que dans l'urine le maximum d'intensité de la coloration a lieu après 20 minutes de développement à la température du laboratoire et à la lumière du jour. A ce moment, on dilue au volume voulu et on lit. Cet avis est partagé par CLARK et THOMPSON (27) et par TAUSSKY (109), tandis qu'ANKER (5), moins rigoureux, n'attend que 15 minutes environ et note une stabilité de 4 heures.

Avec la méthode de FOLIN pour l'urine, nous lisons 15 minutes après le mélange des réactifs en diluant juste avant la lecture. Nous observons une stabilité satisfaisante

pendant 30 minutes au moins.

Pour le sang, l'appréciation du facteur temps varie aussi beaucoup suivant les auteurs. POPPER, MANDEL et MAYER (93), font la lecture 20 minutes après alcalinisation de leur défécate picrique; la coloration serait maximum après 12 à 15 minutes, puis resterait constante pendant un temps assez long. En cas d'hyperglycémie, il ne faudrait cependant pas dépasser 20 minutes, le glucose réduisant lentement l'acide picrique en donnant une coloration parasite. HAUGEN (55) pense que même le glucose normalement présent dans le sang peut interférer, si on tarde à faire la lecture.

PETERS (90) qui dose la créatinine sanguine et urinaire à l'aide de la méthode de FOLIN et WU modifiée, adopte également 20 minutes, temps après lequel la coloration resterait stable pendant 2 heures et demie au moins.

La technique de FOLIN et WU telle que nous l'avons suivie dans nos dosages sur le sérum, comporte 15 minutes d'attente avant la lecture. Avec le sérum normal la stabilité de la coloration est d'au moins 15 minutes.

BONSNES et TAUSSKY (18) ont établi que la coloration est avant tout fonction de la concentration en alcali, la vitesse de développement étant inversement proportionnelle à la quantité d'alcali présent. A mesure que la concentration en soude augmente, l'intensité de la coloration due à la créatinine diminue, tandis que celle due au picrate alcalin augmente. Il s'ensuit que la réaction du filtrat provenant de la déprotéinisation peut avoir une grande influence sur l'évolution ultérieure de la coloration. En effet, suivant leur nature, les agents de défécation donnent des filtrats acides, neutres ou alcalins. BONSNES et TAUSSKY préconisent un mode opératoire qui, dans le cas du sang, comprend un temps de développement de 15 minutes; la stabilité serait de 30 minutes au moins.

LØKEN (80), il y a peu de temps, a confirmé les remarques de BONSNES et TAUSSKY. Il ajoute que l'excès de soude doit toujours être le même dans chaque lot de réactif picrique; quelle que soit la température où l'on prépare la solution saturée d'acide picrique, il faut d'abord neutraliser exactement cette solution, puis l'additionner d'une quantité, fixée une fois pour toutes, de soude. Dans ces conditions, la coloration atteint son maximum d'intensité au bout de 12 minutes et elle ne s'affaiblit pas pendant les 90 minutes qui suivent.

ROSCOE (96), dont les observations ont été vérifiées par

OWEN et coll. (87), note aussi l'influence de la concentration en alcali. Les défécats d'acidité différente, traités par une même quantité de picrate alcalin, donnent des colorations qui évoluent d'autant plus lentement que le pH du défécats est plus acide. Ainsi, la coloration de JAFFE est maximum après 25 minutes dans un filtrat tungstique de pH 2,2, elle devient maximum après 60 minutes seulement, si le pH du filtrat est de 1. A la suite de ces remarques, ROSCOE propose une méthode de dosage de la créatinine sérique dans laquelle la lecture se fait 25 à 30 minutes après l'addition des réactifs.

Dans les méthodes par adsorption-élution - dont fait d'ailleurs partie celle de LØKEN - on préfère le plus souvent avec FOLIN le temps de 10 minutes nécessaires à l'élution de la créatinine et au développement simultané de la coloration; à cela s'ajoutent encore 5 à 10 minutes de centrifugation. La coloration reste généralement inchangée pendant 1 heure, ce qui rapproche alors le sérum de la solution pure de créatinine quant à la stabilité de la coloration. Après avoir comparé entre elles la méthode originale de FOLIN et WU, celle de PHILIPS et une modification de la technique de BONSNES et TAUSKY (18), LAUSON (77) préfère la méthode de PHILLIPS qui fait lire la coloration après 60 et 120 minutes pour extrapoler ensuite au temps 0.

L'influence des chromogènes non-créatininiques, tels que le glucose, sur l'évolution de la réaction de JAFFE ne laisse plus aucun doute (53,77,55,87). HAUGEN (64) n'écarter pas non plus l'influence de la concentration des réactifs défécants, tungstate et acide sulfurique. Ceci nous amène à parler de la relation qui existe entre le pH et la quantité de créatinine retrouvée dans les filtrats, question qui a fait l'objet de nombreux travaux parmi lesquels les plus systématiques sont ceux de MANDEL et JONES (81) et d'OWEN, IGGO, SCANDRETT et STEWART (87). En ce qui concerne la défécation tungstique, la conclusion générale est que le rendement en créatinine est le meilleur avec les filtrats dits "acides" (pH inférieur à 2,5) par opposition aux filtrats "neutres" (pH supérieur à 2,5); le pH optimum se situe autour de 2. Deux explications ont été proposées à cela (87):

1) les différences observées avec les deux sortes de filtrats sont plus apparentes que réelles. En effet, la densité optique du picrate de créatinine augmente quand l'acidité croissante du milieu entraîne une diminution progressive de la concentration en alcali, et comme les colorations développées dans les filtrats "acides" sont comparées à celles développées en milieu aqueux, l'accroissement de l'intensité de la coloration (= la quantité de créatinine apparemment retrouvée) est plus notable, si le filtrat est plus acide;

2). Des pertes en créatinine peuvent se produire par adsorption sur le précipité de protéines.

Ces explications sont probablement valables toutes les deux. La première s'accorde surtout avec le fait que dans le filtrat "acide" on retrouve souvent plus de 100 pour 100 de la créatinine surajoutée. Pour prouver les pertes par adsorption sur les protéines, on se heurte à la difficulté qu'il y a d'obtenir un précipité protéique suffisamment débarrassé du liquide qui renferme la créatinine. D'un autre côté, il a été prouvé que la quantité de créatinine retrouvée dépend de la concentration en protéines, une diminution de celle-ci entraînant une diminution du pH du défécât.

En résumé, nous constatons que l'accord est loin d'être réalisé au sujet du temps de développement de la coloration de JAFFE à cause de la concentration, très variable d'une méthode à l'autre, du milieu réactionnel et par suite des conditions d'acidité différentes avec chaque type de défécation.

Dans l'ensemble, ni la lumière du jour, ni la lumière artificielle n'affectent la coloration, de sorte que si l'éclairage est tant soit peu uniforme, il n'y a pas de précaution spéciale à prendre de ce côté-là.

Les récentes méthodes par adsorption sur argile (v.p 39) permettent d'opérer sur un milieu dont le pH est relativement stable et qui se rapproche sensiblement de la solution pure de créatinine.

D.- INFLUENCE DE LA TEMPERATURE:

Plusieurs auteurs avaient indiqué autrefois que la température devait rester constante pendant toute la durée de la réaction. Mais la plupart des publications parues par la suite ne se sont plus préoccupées de ce facteur. Plus récemment, quelques expérimentateurs ont repris cette question.

OWEN et coll.(87) ont montré qu'une augmentation de la température entraîne une augmentation de la densité optique du picrate alcalin et du picrate de créatinine, phénomène qui est d'ailleurs réversible. Cependant, les variations de température importent peu entre 15° et 25°. C'est avant tout la température au moment de la lecture qui importe. Avec HAUGEN (54) et HERVEY (62), qui, lui, accorde plus d'importance à la température des solutions au moment de la lecture qu'au temps de développement de la coloration, ils recommandent d'éviter l'échauffement du liquide coloré lors du séjour dans l'instrument de mesure, mais, à notre avis, les variations de température dans l'absorptiomètre n'ont pas toujours l'im-

portance qu'on leur attribue, vu la rapidité avec laquelle on peut faire les mesures (une dizaine de secondes au maximum).

Pour LØKEN (80), l'influence de la température varie avec l'alcalinité de la solution finale. Par exemple, si on porte la concentration finale en soude de 0,04 n à 0,1 n, la différence dans les densités optiques lues à 18° et à 29° passe de 2 pour 100 à 8 pour 100 environ.

E.- PURETE ET CONSERVATION DES REACTIFS :

Les solutions de référence de créatinine doivent se faire dans l'acide chlorhydrique 0,1 n; on recommande de les garder sous toluène ou à la glacière; la conservation ne devrait pas excéder 1 mois. Le délai de 6 mois, avancé par TAUSKY (109), nous paraît exagéré. Si on n'est pas sûr de la pureté de la créatinine dont on dispose, il est préférable de faire une recristallisation dans l'eau ou mieux, une purification en passant par la combinaison avec le chlorure de zinc; celle-ci peut d'ailleurs servir à préparer les solutions étalons. Nos expériences ont été réalisées avec de la créatinine MERCK, séchée sous vide.

L'acide picrique doit être pur et sec, conservé à l'abri de la lumière et doit satisfaire au test de FOLIN et DOISY (38) qui exige que la coloration de la solution saturée de ce corps ne soit pas accrue de plus de la moitié de sa valeur primitive après addition du vingtième de son volume de soude à 10 pour 100. La plupart des acides picriques du commerce doivent être purifiés. On peut le faire par recristallisation dans le benzène, précipitation par addition d'acide chlorhydrique à une solution aqueuse, recristallisation dans l'acide acétique ou dans une solution de carbonate de sodium suivie de lavages à l'acide chlorhydrique. Les deux derniers procédés, dus à BENEDICT (11), donnent un acide picrique particulièrement satisfaisant quand il est soumis au test de FOLIN et DOISY. Les solutions d'acide picrique doivent être saturées à froid, conservées à l'abri de la lumière pendant un laps de temps au plus égal à 1 mois. La solubilité de l'acide picrique variant beaucoup avec la température, PETERS (90) et d'autres auteurs ont préconisé une solution dont le titre soit bien déterminé, à savoir 11,75 g par litre, donc légèrement inférieur à la saturation qui est de 12,2 g par litre à 20°. Pour nos dosages de créatinine, nous avons employé l'acide picrique "purissimum" MERCK ou bien un acide commercial purifié par le procédé de recristallisation dans l'acide acétique glacial selon BENEDICT. Pour obtenir des solutions saturées convenables, nous dissolvons environ 16 g d'acide

picrique pur dans un litre d'eau distillée en chauffant à 80°; après avoir laissé refroidir à la température du laboratoire, l'acide picrique en excès cristallise. Nous décantons soigneusement la solution surnageante qui est conservée en flacon brun après avoir été soumise au test de FOLIN et DOISY. Cependant, les variations de température au laboratoire dont le chauffage est discontinu, nous ont contraint à garder les solutions d'acide picrique dans une étuve à 30°; au moment de l'emploi elles sont amenées à 18° par immersion dans un bain-marie. En effet, nous avons remarqué à quel point la constance du titre des solutions d'acide picrique est nécessaire pour avoir des résultats reproductibles. Il faut éviter de préparer longtemps à l'avance le mélange acide picrique + soude, car il s'altère rapidement; par contre, l'addition de carbonate de sodium (emploi d'une soude carbonatée, par exemple) n'est pas nuisible au réactif picrique.

F.- SPECIFICITE DE LA REACTION DE JAFFE :

Le manque de spécificité de cette réaction est connu de longue date et la liste des substances qui donnent une réaction positive n'a cessé de s'allonger. En 1928, un travail systématique (II3) sur les substances organiques capables de donner une réaction positive, substances que nous appellerons chromogènes, avait établi que tous les corps possédant un radical méthylène CH_2 ou méthine CH "actifs", avaient une réaction de JAFFE positive. Comme activants des radicaux organiques cités, on a classé par ordre d'activité décroissante: NO_2 , $\text{N}=\text{N}$, CO , $\text{CH}=\text{CH}_2$, CONH_2 et COOC_2H_5 . En réalité, les chromogènes qu'on peut rencontrer dans les milieux biologiques ne sont pas très nombreux. Citons parmi les plus importants l'acétone, l'acide acétylacétique, l'acide pyruvique, l'acétaldéhyde, l'acide lévulinique ou acétylpropionique, l'acide glycuronique, l'acide ascorbique, la glycocyamidine...

DORNER, cité par GUGGENHEIM (51), affirme que la glycocyamidine produit une coloration qui est la moitié de celle donnée par la même quantité de créatinine.

ZIMMERMANN (II6) a remarqué que le caractère JAFFE-positif des stéroïdes du groupe des hormones sexuelles tenait à la présence d'un groupement COCH_2 . C'est d'ailleurs par analogie avec la réaction de JAFFE, qu'il a développé la réaction au méta-dinitrobenzène en milieu alcalin pour le dosage colorimétrique des stéroïdes à groupement cétonique libre.

ZIMMERMANN (II7) a travaillé, entre autres, sur l'androstérone, la testostérone, l'oestrone et l'équiline. Au cours

d'essais personnels, nous avons vérifié que la testostérone, la folliculine et la transdéhydroandrostérone (utilisée comme substance étalon dans le dosage des 17-cétostéroïdes urinaires) donnent une coloration orangée avec le réactif picrique à froid. Cependant, ces corps ont peu de chances de perturber le dosage de la créatinine, car, à quantité égale, ils réagissent beaucoup plus faiblement que la créatinine; par exemple, la réaction de la transdéhydroandrostérone et celle de la testostérone sont plus de 100 fois plus faibles que celle de la créatinine effectuée dans les mêmes conditions.

L'acide ascorbique réagit déjà à froid avec le réactif picratosodique, mais nous avons pu nous rendre compte que la réaction est 130 fois plus faible qu'avec la créatinine. Des expériences personnelles dont on trouvera le détail p. 82 indiquent que dans le dosage de la créatinine urinaire par la méthode classique de FOLIN, l'acide ascorbique ne devient gênant qu'à partir d'une concentration de 0,3 g/100 ml (prise d'essai = 1 ml).

Il existe aussi des substances qui ne sont JAFFE-positives qu'à chaud; il s'agit alors de réducteurs de l'acide picrique qui ont une action très lente à froid, de sorte qu'elle ne gêne que peu celle de la créatinine. C'est le cas du glucose, du fructose, de la glucosamine, des dicétopipérazines, de l'insuline, de la cystine, du tryptophane, etc.. L'acide urique et l'histidine ne donnent pas de réaction à froid, tandis qu'ils réagissent positivement à chaud, l'acide urique donnant une coloration plus foncée que l'histidine.

La créatine et ses dérivés ne donnent pas la réaction de JAFFE. Mais après un temps de contact assez long avec le picrate alcalin, il apparaît dans les solutions de créatine une coloration orangée due à la formation lente de créatinine. De nos expériences personnelles avec des solutions aqueuses de créatine et de créatinine, traitées dans les mêmes conditions, il résulte que la créatine donne une réaction 220 fois plus faible que celle de son anhydride interne, le temps de contact avec le réactif picrique ayant été fixé à 15 minutes. Remarquons que le dosage de la créatinine totale où on chauffe, soit au bain-marie, soit à l'autoclave, ne doit pas être faussé par les corps actifs à chaud à cause du milieu acide indispensable à la transformation de la créatine en créatinine. Cependant, le chauffage avec l'acide chlorhydrique produirait d'après LINNEWEH (79) dans 10 pour 100 des urines analysées des polyoxyphénols qui augmentent les résultats de 20 à 30 pour 100.

DIRR et SCHADE (28) confirment le caractère gênant des di- et triphénols pour le dosage des corps créatiniques dans

l'urine; il s'agit en particulier de la pyrocatechine, de la résorcine, de l'hydroquinone et du pyrogallol. De plus, des substances médicamenteuses comme l'urotropine, le car-diazol, le gardénal sodique, le salol, la codéine ainsi que leurs produits de transformation dans l'organisme, influen-ceraient positivement la réaction de JAFFE. Cependant, une observation personnelle montre qu'en solution à 0,1 g par litre, le gardénal sodique ne réagit pas directement avec le picrate alcalin.

Enfin, mentionnons que la réaction de JAFFE est égale-ment positive avec un certain nombre de corps de la chimie minérale; sulfate ferreux, hydrogène sulfuré, sulfure d'am-monium et trichlorure de titane, par exemple.

Depuis longtemps l'attention a été attirée sur les sels neutres dont la présence abaisserait l'intensité de la colo-ration. Les sels alcalino-terreux seraient particulièrement actifs en ce sens. Mais des travaux plus modernes comme ceux de LAGRANGE (74) et de SALVIAT (98) sur l'action du chloru-re de sodium ne confirment pas cette manière de voir, tout au moins en ce qui concerne les sels de métaux alcalins.

Malgré le nombre impressionnant de travaux qui y ont été consacrés depuis près de 40 ans, le problème de la na-ture des chromogènes non-créatininiques dans le sang et dans l'urine n'a pas trouvé de solution entièrement satis-faisante.

Les observations de HUNTER et CAMPBELL (66) sur l'in-fluence de l'acétone et de l'acide acétylacétique dans le dosage de la créatinine urinaire et sur la richesse des globules rouges en chromogènes autres que la créatinine, ont résumé pendant longtemps tout ce qu'on savait dans ce domaine. Le long débat sur la présence ou l'absence de la créatinine dans le sang avait donné le jour à de nombreuses hypothèses sur la nature de la ou des substances JAFFE-positives du sang, mais aucune de ces hypothèses n'a résis-té à la critique. Les travaux de MILLER et DUBOS (85), qui associent la présence de grandes quantités de chromogènes dans le sang à une importante azotémie, ont marqué un pro-grès sensible. Mais ce n'est qu'en 1950, que KOSTIR et RA-BEK (72) se sont attaqués d'une façon systématique à ce problème. Ils se basent sur les données suivantes:

1). la réaction de JAFFE est influencée par des substances qui sont, soit faiblement JAFFE-positives, soit activantes ou inhibitrices de cette réaction,

2). la réaction de JAFFE est influencée par une ou plu-sieurs substances nettement JAFFE-positives. S'aidant de

la chromatographie sur papier, les auteurs tchèques arrivent aux conclusions suivantes:

- a) l'hydantoïne et la méthylhydantoïne sont pratiquement absentes du sérum ou du moins, elles ne sont pas décelables par la réaction de JAFFE dans les conditions employées;
- b) les essais faits permettent d'éliminer la créatine;
- c) la présence de glycocyamidine reste douteuse. Les expériences faites avec de la glycocyamidine surajoutée avant la chromatographie, ne semblent pas être en faveur de l'existence de ce corps dans le sérum; s'il s'y trouve, c'est en quantité trop faible pour être gênant;
- d) vis-à-vis de l'acide ascorbique, la réaction de JAFFE est trop peu sensible pour le déceler dans le sérum, même s'il s'y trouve en forte concentration;
- e) l'identification, à côté de la créatinine, de l'acide pyruvique, confirmée par polarographie et analyse spectrophotométrique des taches obtenues, donne au problème de la créatinine apparente une solution partielle.

Donc, pour KOSTIR et RABEK, c'est l'acide pyruvique qui est le grand perturbateur de la réaction de JAFFE dans le sang.

MANDEL et JONES (81) prétendent avoir trouvé chez des individus à créatininémie normale une proportion de 18 à 31 pour 100 de chromogènes non-créatininiques sur le chromogène total dosé par la modification de BONSNES et TAUSKY (18). Ces chiffres s'écartent sensiblement des 0 à 19 pour 100 donnés par MILLER et DUBOS (85). Dans les sérums d'azotémiques par contre, les premiers ne trouvent que 0 à 12 pour 100 de chromogènes étrangers à la créatinine.

HAUGEN (55) a étudié l'action du glucose et de l'acétone sur les déterminations de la créatinine plasmatique en ajoutant de ces substances des quantités analogues à cellesqu'on peut trouver chez les diabétiques, à des solutions aqueuses de créatinine et à du plasma normal. Il remarque une augmentation des valeurs de la créatinine dans tous les cas. Chez des individus normaux, le glucose et l'acétone n'affectent pas le dosage de la créatinine plasmatique, l'augmentation maximum que peut produire une glycémie normale sur le résultat en créatinine étant de 0,03 mg/100 ml. Mais comme nous l'avons déjà dit, un contact prolongé avec le picrate alcalin avant la lecture de la coloration, peut fausser le résultat. D'ailleurs, comme

le remarque fort judicieusement HAUGEN, il se peut que le plasma de diabétique contienne en plus du glucose et de l'acétone d'autres substances JAFFE-positives, comme par exemple des corps cétoniques capables d'ajouter leur influence à celle des corps cités.

De même LAUSON (77) voit dans le glucose une source d'erreur importante, mais il note qu'en présence de fortes quantités de créatinine, la coloration due au glucose et aux autres chromogènes non-créatininiques du plasma est diminuée, voire supprimée. La concentration du plasma en chromogènes non-créatininiques serait approximativement la même chez les enfants et chez les adultes, tandis que la teneur en créatinine vraie, très faible chez le jeune enfant, augmenterait avec l'âge pour atteindre finalement les valeurs de l'adulte.

Des expériences personnelles nous ont montré que dans le dosage de la créatinine selon FOLIN et WU, le glucose n'apporte de perturbation qu'à partir d'une concentration égale à 100 mg/100 ml (prise d'essai = 10 ml). Dans le cas de l'acétone, la concentration gênante est égale ou supérieure à 15 mg/100 ml (même prise d'essai). Pour l'acide pyruvique, traité dans les mêmes conditions, l'influence perturbatrice est beaucoup plus accusée et se manifeste déjà pour une concentration égale ou supérieure à 0,4 mg/100 ml (même prise d'essai). Ces résultats ont été vérifiés sur du sérum chargé artificiellement en glucose, acétone ou acide pyruvique; des dosages pratiqués sur des sérums pathologiques (diabète, hyperpyruvicémie après choc cardiologique) ont apporté une preuve supplémentaire de l'influence perturbatrice de ces corps qui, selon toute vraisemblance, sont accompagnés d'autres substances chromogènes encore indéterminées; ceci nous semble surtout valable chez le diabétique avancé (résultats numériques, p. 74).

En ce qui concerne l'urine, le problème de la nature des chromogènes se pose d'une façon moins impérieuse, la créatinine représentant la presque totalité du matériel chromogène présent. La chromatographie sur papier a démontré (71) la présence de glycocyamidine dans l'urine; le rapport créatinine / glycocyamidine étant toujours compris entre 6/1 et 3/1 dans les urines normales aussi bien que dans celles des diabétiques, des cirrhotiques et des néphritiques chroniques, le dosage de la créatinine par la réaction de JAFFE ne serait pas gêné.

Nous-même avons effectué un dosage de créatinine par la méthode de FOLIN sur une urine de diabétique contenant au litre 19,3 g de glucose, 0,55 g d'acétone et 2,4 g d'albumine, sans noter de perturbation apportée par ces corps.
(v.p. 78)

D'ailleurs, dosant avant et après défécation la créatinine dans des urines de néphritiques et de néphrotiques contenant jusqu'à 15 g d'albumine au litre, il nous a été impossible de constater une différence. La défécation de l'urine albumineuse n'est donc pas indispensable pour doser correctement la créatinine, contrairement à ce qui a été généralement admis jusqu'ici. (v. p. 88).

Il apparaît donc qu'à part le glucose et les corps cétoniques (acétone, acide acétylacétique et surtout acide pyruvique) dont l'influence est certaine, il faille admettre l'existence d'une ou de plusieurs autres substances chromogènes, non encore identifiées, pour expliquer les faits expérimentaux et cliniques.

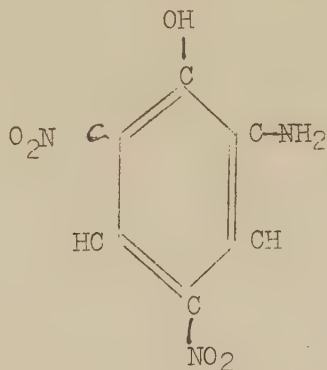
G.-ELIMINATION DES CHROMOGENES.

Pour éliminer les corps cétoniques éventuellement présents, on a proposé la distillation sous pression réduite en présence d'acide phosphorique ou encore l'ébullition avec un excès d'alcool méthylique. Ces procédés, assez laborieux, sont délaissés aujourd'hui. On leur préfère actuellement l'adsorption quantitative de la créatinine urinaire et sanguine sur du réactif de LLOYD, la réaction de JAFFE se faisant après élution (v.p. 39). On arrive ainsi à réduire au minimum des perturbations apportées par les corps gênants qui, dans les conditions opératoires choisies, ne sont pas du tout ou seulement très peu fixés; le pH joue ici un rôle de premier plan. Les procédés basés sur l'adsorption-élution sont certainement les meilleurs pour doser spécifiquement la créatinine; pour éliminer les chromogènes, ils sont de loin préférables aux traitements chimiques qui, eux, sont toujours plus ou moins violents. La catégorie de ces derniers s'est enrichie récemment de l'oxydation au sulfate cérique (73) et de l'oxydation par l'iode en milieu légèrement acide. L'action favorable du sulfate cérique qui, lors du dosage de la créatinine du sérum, détruirait l'acide pyruvique, n'a pas été confirmée. L'oxydation par l'iode a été préconisée par TAUSSKY (109), afin de supprimer l'influence de corps comme l'acide ascorbique, l'acétone, l'acide acétylacétique dans le dosage de la créatine et de la créatinine urinaires. Les résultats de nos recherches au sujet de l'acide ascorbique montrent l'inutilité de l'oxydation par l'iode (v.p. 82).

H.-MECANISME DE LA REACTION DE JAFFE. NATURE DU CORPS RESPONSABLE DE LA COLORATION.

Le mécanisme de cette réaction a été longtemps discuté.

On avait d'abord attribué la coloration à la formation d'acide picramique dont la formule est la suivante:



De fait, les corps réducteurs (énumérés dans le chapitre précédent) qui paraissent JAFFE-positifs, à froid ou à chaud, donnent bien naissance à de l'acide picramique, mais dans le cas de la créatinine aucune détermination n'a pu confirmer cette hypothèse. En 1925, GREENWALD (47) affirme que l'acide picrique entre dans la molécule du corps responsable de la coloration rouge orangée. Cet auteur suppose qu'il existe 2 picrates de créatinine: un jaune, stable en milieu acide, correspondant à la forme cétonique de la créatinine (fig. 1), et un rouge qui, lui, prendrait naissance en milieu alcalin et correspondrait à la forme tautomère énolique de la créatinine (fig. 2). Ce picrate rouge de créatinine a été d'abord isolé sous forme de sel de baryum, puis sous forme de sel d'ammonium et finalement il a été obtenu tel quel.

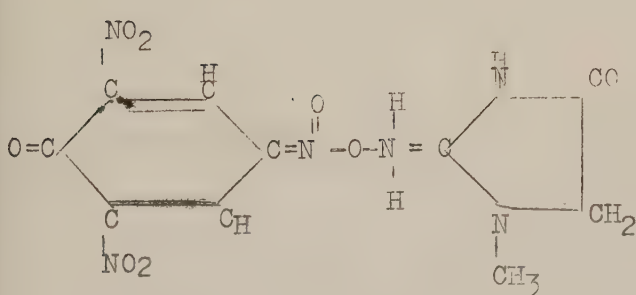


Figure N° 1

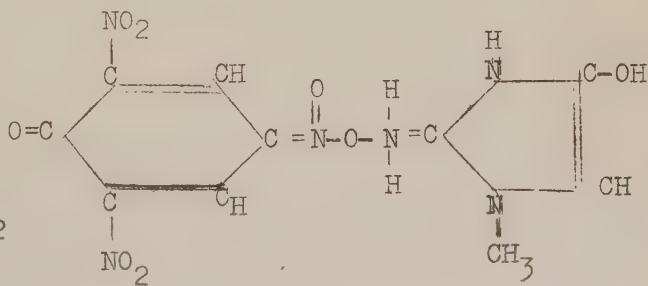


Figure N° 2.

En 1928, GREENWALD (48) isole 2 produits cristallisés

dont l'un, ayant la composition: 2 créatinine, 1 acide picrique, 2 NaOH, 3 H₂O, donne la réaction de JAFFE sans que son intervention dans la réaction habituelle soit prouvée. Néanmoins, l'hypothèse selon laquelle un picrate de créatinine énolique rouge donne la coloration, est confirmée par GREENWALD (49) qui réussit à libérer du picrate rouge à partir du composé ci-dessus, traité par l'acide chlorhydrique en quantité suffisante pour neutraliser la soude.

En 1937, BOLLIGER (17) reprend cette étude et décrit quatre corps rouges formés par union de 1 molécule d'acide picrique et de 1 molécule de créatinine avec, respectivement, 2 molécules de soude et 2 molécules d'eau, 3 molécules de soude et 4 molécules d'eau, 3 molécules de soude et 2 molécules d'eau et 4 molécules de soude et 4 molécules d'eau. BOLLIGER pense que le dernier composé qui tire sur l'orangé et représente le maximum de saturation avec l'alcali, est responsable de la réaction de JAFFE.

L'acide picrique n'est d'ailleurs pas le seul composé nitroaromatique susceptible de donner des produits colorés avec la créatinine. Le 1,3,5-trinitrobenzène, le 2,4,6-trinitrotoluène, l'acide 2,4,6-trinitrobenzoïque donnent une faible coloration rouge en milieu alcalin. C'est au cours d'études systématiques dans ce domaine qu'a été découvert l'acide 3,5-dinitrobenzoïque comme dérivé nitré capable de réagir avec la créatinine.

Dans le même ordre d'idées, nous avons étudié, en présence de quantités variables d'alcali (soude, carbonate, bicarbonate), l'action sur la créatinine d'une autre substance nitrée cyclique, la 5-nitro-2-furfural-semicarbazone, antibiotique récemment introduit dans l'arsenal thérapeutique sous le nom de nitrofurazone. Il a été impossible de savoir s'il y avait une réaction colorée avec la créatinine, la coloration rouge brunâtre que donne la nitrofurazone en milieu même très faiblement alcalin, masquant toute coloration éventuelle due à la créatinine.

2.- LA METHODE ENZYMATIQUE DE MILLER ET DUBOS.

Deux microbiologistes américains, DUBOS et MILLER (31), ont isolé par ensemencement de milieux liquides où la créatinine constituait le seul composé organique, des espèces bactériennes capables de décomposer d'une manière à peu près spécifique la créatinine. Les bactéries en question vivent dans le sol. Par passages répétés sur milieu synthétique, ils ont pu isoler finalement 4 types différents de bactéries: le type NC, identifié par la suite comme étant Coryne-

bacterium ureafaciens, le type HR ainsi que 2 autres types de moindre importance appelés A et B. L'activité enzymatique des bactéries du type NC s'exerce sur la créatinine qui seule est rapidement décomposée. Le transfert du groupement méthyle de la position 3 en 5 diminue notablement la vitesse de décomposition. L'addition d'un groupement méthyle à la molécule de créatinine inhibe totalement l'enzyme. Parmi les substances JAFFE-négatives la créatine, l'acide guanidine-acétique, la méthylguanidine et l'arginine sont décomposés au même degré que la créatinine. La présence d'une liaison genre guanidine apparaît donc comme élément important de la spécificité de l'enzyme. Rappelons qu'il molécule de créatinine donne naissance dans ces conditions à 1 molécule d'urée, la méthylguanidine étant un intermédiaire probable; le sort du reste de la molécule de créatinine n'a pu être nettement élucidé.

L'enzyme du type bactérien HR attaque la créatinine et plus lentement la glycoxyamidine. Ici tout l'azote se retrouve sous forme d'ammoniac et d'urée. Cet enzyme est doué d'une spécificité plus grande, car il n'attaque ni la glycoxyamine, ni la méthylguanidine, ni la méthylhydantoïne, ni l'arginine.

Il s'agit dans ce cas d'enzymes d'adaptation, par opposition aux enzymes constitutifs, conformément à la définition de KARSTROEM.

En principe, la méthode enzymatique s'applique au sang et à l'urine de la manière suivante (85): on dose par la réaction de JAFFE l'équivalent de créatinine du milieu, avant et après incubation avec la préparation enzymatique, utilisée sous forme de cellules bactériennes lavées. La différence entre les deux dosages représente la créatinine vraie. Les erreurs viennent surtout du dosage du chromogène résiduel qui joue le rôle de terme correctif; si sa valeur est relativement élevée, la précision du dosage devient aléatoire, aussi est-il recommandé de faire en triple le dosage du chromogène résiduel. Le dosage dans l'urine est plus précis, parce que le chromogène résiduel y représente presque toujours une fraction infime.

La technique enzymatique de MILLER et DUBOS constitue le procédé spécifique par excellence; elle a le grand inconvénient d'être laborieuse et d'une application plutôt délicate. C'est un instrument précieux qui a fait ses preuves surtout au cours de recherches théoriques telles que la question de la présence de la créatinine dans le sang. Pour la pratique courante elle se laisse remplacer par les méthodes d'adsorption sur argile, plus maniables et d'une précision pratiquement égale.

3.- LE DOSAGE DE LA CREATININE PAR LA METHODE DE L'ADSORPTION-ELUTION.

L'adsorption de la créatinine sur charbon de bois, signalée en 1915 par SUDENDORF et LAHRMAN (107), n'a pas trouvé d'application pratique.

En 1918, GREENWALD et MAC GUIRE (50) ont montré l'adsorption possible de la créatinine sur le kaolin, silicate d'aluminium, qui cependant s'est révélé être un adsorbant de qualité médiocre. En effet, nous avons remarqué qu'à quantité égale, il est moins actif que le réactif de LLOYD et les argiles montmorillonitiques. La présence d'acide oxalique diminue la quantité adsorbée; l'adsorption n'est totale qu'avec une solution pure de créatinine. La créatinine urinaire est loin de se fixer quantitativement. Autre inconvénient, les essais à blanc ont une valeur plus élevée qu'avec les autres adsorbants. Nous avons définitivement abandonné l'étude et l'emploi du kaolin.

L'adsorbant de la créatinine le plus fréquemment préconisé est le réactif de LLOYD, destiné primitivement à l'extraction des alcaloïdes de leurs solutions acides ou neutres. Son emploi pour l'étude de la créatinine date de 1922. C'est essentiellement un silicate d'aluminium hydraté qu'on obtient à partir de la terre à foulon et auquel WALDBOTT (112) attribue la composition centésimale approximative suivante: H_2O 17,41; SiO_2 55,3; Al_2O_3 9,82; Fe_2O_3 14,18; CaO 1,58. Le chauffage au rouge fait disparaître ses propriétés adsorbantes. Après élution de la substance fixée, le réactif garde toute son activité.

Parmi les adsorbants plus récents, le trisilicate synthétique de magnésium ou encore les résines échangeuses d'ions présentent les mêmes inconvénients que le kaolin. Par contre, les argiles montmorillonitiques, convenablement traitées, valent le réactif de LLOYD pour fixer la créatinine des milieux biologiques (Chapitre V).

Les travaux théoriques de BEHRE et BENEDICT, FOLIN et BERGLUND, GAEBLER et KELTCH, SHANNON, JOLLIFTE et SMITH mis à part, les premières méthodes pratiques de dosage de la créatinine par la technique de l'adsorption-élution datent de 1935 et 1937 (BORSOOK, FISHER et WILHELMI).

BORSOOK (19) fixe la créatinine sur du réactif de LLOYD en milieu chlorhydrique. FISHER et WILHELMI (33) se servent d'une terre à foulon commerciale, activée par des lavages répétés à l'acide chlorhydrique; ils signalent l'importance de la réaction du milieu qui doit être acide et du rapport des quantités d'adsorbant et de créatinine à fixer. Selon

eux, la quantité adsorbée ne varie pas pour des normalités d'acide chlorhydrique comprises entre 0,4 et 2,5 n (concentration finale). Nous montrerons (p. 62) que le réactif de LLOYD, acidifié préalablement, adsorbe la créatinine au même degré à tous les pH inférieurs à 7.

FISHER et WILHELMI ont constaté une forte hydratation de leur adsorbant, ce qui est très gênant lors de l'élution. L'addition de chlorure de baryum et l'élution en solution alcoolique favoriseraient la sédimentation des particules au cours de la centrifugation. La sensibilité de ces méthodes est de l'ordre du microgramme.

Il faut attendre jusqu'en 1950 pour voir réapparaître avec HARE (53) une méthode qui, s'inspirant de celle de BORSOOK, donne une nouvelle faveur aux dosages par adsorption-élution et qui autorise l'espoir de pouvoir déterminer la créatinine par un procédé moins laborieux, mais aussi spécifique que la méthode enzymatique de MILLER et DUBOS (85).

HARE fixe la créatinine urinaire et sanguine sur du réactif de LLOYD en présence d'une solution saturée d'acide oxalique. L'urée, l'inuline, le thiosulfate, le ferrocyanure et l'acide para-amino-hippurique qui, lui, est JAFFE-positif, ne gênent pas aux concentrations utilisées dans l'étude de la fonction rénale.

L'hémolyse des échantillons de sang ne semble pas constituer une source d'erreur, avis qui est partagé par LØKEN (80); cependant, pour HARE (53) une protéine adsorbée et éluee dans les mêmes conditions que la créatinine serait chromogène; par conséquent, il faudrait veiller à avoir des filtrats sériques et des échantillons d'urine complètement dépourvus de protéines.

MILLER et MILLER (86) ont vérifié la valeur du procédé de HARE en le comparant à la méthode enzymatique. Les résultats, qui portent sur 30 sérums différents, concordent bien. LAUSON (77), GRANT (46), MANDEL et JONES (82) se sont aussi ralliés à la méthode de HARE pour la détermination correcte de la clearance de la créatinine endogène.

Cependant, OWEN et coll. (87) ont observé de légères différences entre les résultats des deux méthodes spécifiques, différences qui seraient dues au fait qu'apparemment les bactéries laissent plus de chromogènes non-créatininiques dans les filtrats. Ils préfèrent donc l'emploi du réactif de LLOYD qui, sur l'urine, leur donne des résultats légèrement inférieurs à ceux obtenus après traitement enzymatique. D'un autre côté, une petite quantité de chromogènes non-créatininiques des défécats plasmatiques et séri-

ques pourrait être adsorbée sur le réactif de LLOYD, mais comme d'après LAUSON (77) la créatinine inhibe la coloration donnée par ces corps, il n'est pas tout à fait correct de soustraire ceux-ci du chromogène total pour avoir la créatinine vraie. (x)

Le détail du mode opératoire développé par OWEN et coll. (87), sera donné avec les expériences sur l'emploi de la montmorillonite, p. 60. Signalons dès maintenant que nous avons supprimé l'addition d'acide oxalique. OWEN et coll. avaient d'ailleurs suggéré eux-mêmes que l'acide oxalique "is probably not necessary", le pH des filtrats tungstiques obtenus étant déjà suffisamment acide pour permettre une fixation quantitative de la créatinine. Dans sa récente publication, LØKEN (80) omet également l'addition d'acide, mais ne donne aucune explication à ce sujet. Cependant, l'acide oxalique est indispensable pour qu'il y ait fixation quantitative, sur le réactif de LLOYD, de la créatinine en solution pure (témoins) et de la créatinine urinaire (v.p. 62).

L'utilité du réactif de LLOYD est prouvée par de nombreuses expériences (53, 81, 87) qui montrent que des solutions aqueuses de créatinine, traitées par le réactif picrique, atteignent rapidement une intensité de coloration constante, tandis que les filtrats plasmatiques continuent à évoluer par suite de la présence de chromogènes non-créatininiques. Par contre, la cinétique de la réaction colorée est la même en solution aqueuse et dans l'urine diluée d'une part, dans les éluats du réactif de LLOYD agité avec une solution pure de créatinine, une dilution urinaire et, ce qui est plus important, avec un défécât sérique ou plasmatique, d'autre part; le maximum d'intensité est atteint au même moment dans tous les cas et la stabilité de la coloration est la même partout.

Les expériences de HAUGEN (55) ont fait ressortir en outre que le réactif de LLOYD diminue considérablement l'influence du glucose et de l'acétone; mais lorsque ces corps sont présents en fortes quantités, il en reste à la surface du culot de centrifugation et sur les parois du tube, de sorte que le résultat final est entaché d'une erreur par excès.

(x) OWEN et coll. (87) rapportent cet argument, mais interprètent mal les résultats de LAUSON. En effet, ils écrivent que "since the non-creatinine chromogen is reported to have an inhibiting effect on colour development (LAUSON, 1951), it may not be strictly correct to subtract the non-creatinine chromogen content, determined with the NC-bacteria, from the total chromogen content...."

Personnellement, nous avons vérifié, en dehors des dosages effectués sur des sérums et sur des urines normales, l'efficacité du réactif de LLOYD en dosant la créatinine dans l'urine de diabétique, dans le plasma d'individus hyperpyruvicémiques et dans le sérum d'un azotémique (v.p.78,80;89)

Puisque le réactif de LLOYD se montre efficace pour diminuer l'influence des chromogènes non-créatininiques, on peut craindre qu'il ne fixe irréversiblement des traces de créatinine sérique quand bien même il ne provoquerait pas de pertes de créatinine en solution pure. LØKEN (80), étudiant cette hypothèse, a signalé une légère adsorption de la matière colorante responsable de la réaction de JAFFE sur le réactif de LLOYD, adsorption qui serait directement proportionnelle à la quantité de réactif de LLOYD et à l'alcalinité de la solution. De plus, elle serait proportionnelle à la quantité totale de créatinine présente dans la solution.

Par contre, il n'y aurait pas d'adsorption du picrate de sodium en solution alcaline. Avec 200 mg de réactif de LLOYD, la perte apparente en créatinine serait de 9 pour 100. D'un autre côté, quand le filtrat trichloracétique (ou tungstique) est agité avec le réactif de LLOYD, il y a toujours un peu d'acide qui est transféré par l'adsorbant à la solution alcaline finale. Cette quantité d'acide entraîné varie entre 0,29 et 0,33 milliéquivalents d'ions H^+ et dépend naturellement de la façon dont le liquide surnageant est décanté. Comme le sérum neutralise par lui-même une petite partie de l'acide, le restant d'acide transféré sera légèrement plus faible que dans l'essai à blanc. Par conséquent, l'excès d'ions OH^- dans le réactif picrique diminue et les valeurs du coefficient d'extinction augmentent. Ceci pourrait expliquer, d'après LØKEN, l'élution totale de la créatinine du réactif de LLOYD en solution alcaline telle que l'affirment les auteurs qui utilisent un réactif picrique préparé avec de la soude à 10 pour 100. L'augmentation de l'extinction sous l'influence de l'acide entraîné serait compensée par la perte apparente de créatinine due à l'adsorption d'une partie du picrate de créatinine. De sorte qu'en fin de compte, si presque 100 pour 100 de créatinine sont retrouvés, c'est d'une manière factice!

Sans vouloir exclure la possibilité de l'adsorption d'une certaine quantité de picrate alcalin de créatinine, ce phénomène, à notre avis, n'a pas l'importance que veut lui attribuer LØKEN. D'ailleurs, la bonne concordance des résultats que nous avons trouvés avec et sans adsorption préalable de la créatinine, n'est pas en faveur de la thèse ingénieuse de LØKEN. (tableaux II, III, IV, p.63, 64,65).

En ce qui concerne la spécificité du réactif de LLOYD, il convient de citer les travaux de KANTUREK, PACOVSKY et SONKA (68) qui, grâce à la chromatographie sur papier, ont montré qu'en même temps que la créatinine, étaient susceptibles de se fixer, par agitation du réactif avec l'urine: des acides cétoniques (acide β -hydroxybutyrique, acide acétylacétique et, à un degré moindre, l'acide pyruvique), l'indol, l'hydantoïne, la glycocyamidine, le cholestérol; des stéroïdes et des pigments non identifiés se fixent probablement en faible proportion. Nous verrons (p.53), que l'emploi du réactif de LLOYD ne nous a pas permis de rendre spécifique la réduction du ferricyanure par la créatinine. En effet, parallèlement à l'adsorption de la créatinine, nous avons étudié si d'autres substances rencontrées dans l'urine ou dans le sang pouvaient se fixer sur le réactif de LLOYD. Après avoir agité quelques ml d'une urine diluée de pH variable avec du réactif de LLOYD, nous nous sommes rendu compte que l'acide urique se fixe comme la créatinine, c'est-à-dire d'autant moins que le pH se rapproche de la neutralité. D'autre part, nous avons observé que le réactif de LLOYD fixe légèrement l'acide ascorbique en solution aqueuse (v.p. 81).

Mais KANTUREK et coll. affirment aussi qu'une certaine quantité de créatinine reste dans le liquide surnageant et n'est pas fixée sur l'adsorbant. Ce dernier résultat nous semble pour le moins douteux à la lumière de nos recherches personnelles; il est peut-être attribuable à ce que tous les échantillons de réactif de LLOYD n'adsorbent pas la créatinine avec la même facilité. OWEN et coll.(87) soulignent qu'avec leur réactif de LLOYD, la créatinine surajoutée à l'urine ou à des défécats de sérum est totalement adsorbée.

Voulant préciser les conditions dans lesquelles la créatinine est éluée, nous avons observé que lors du traitement du réactif de LLOYD par des solutions-tampons d'alcalinité croissante, la quantité de créatinine qui est éluée, augmente progressivement jusqu'à pH 10 où l'élu-tion est totale; le réactif picratosodique employé par OWEN et coll. a un pH compris entre 10,8 et 11; il assure donc une élution totale de la créatinine fixée.

Avec l'urine, l'emploi du réactif de LLOYD s'impose moins, la réaction de JAFFE étant d'une spécificité suffisante pour pouvoir y doser directement la créatinine. Cependant, vis-à-vis des techniques genre FOLIN, la méthode d'OWEN (87), outre la spécificité plus grande qui permet de doser avec la même précision la créatinine dans les urines normales et pathologiques, comporte l'avantage no-

table d'une forte dilution de l'urine qui fait qu'on se trouve dans une région où la loi de BEER-LAMBERT est entièrement valable.

L'emploi du réactif de LLOYD traité auparavant par l'acide chlorhydrique comme les argiles montmorillonitiques, ne nous a pas donné satisfaction. En effet, les résultats trouvés sur le sérum (tableau VIII, p.70) sont toujours supérieurs à ceux que donne la méthode directe de FOLIN et WU, de sorte qu'il est permis de penser que l'acide chlorhydrique libère du réactif de LLOYD une substance JAFFE-positive ou une substance réductrice capable de transformer l'acide picrique en acide picramique. Cette dernière hypothèse est d'autant plus vraisemblable, qu'au cours de nos expériences sur la réduction du ferri-cyanure par la créatinine, nous avons remarqué que le réactif de LLOYD contient une proportion assez notable de matières réductrices qui sont vraisemblablement de nature humique.

4.- CARACTERISATION ET DOSAGE DES CORPS CREATINIQUES A L'AIDE DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

C'est MAW (83) qui, le premier, a appliqué la chromatographie sur papier à l'étude de la créatine et de la créatinine. Partant d'une prise d'essai contenant de 5 à 10 μ g de créatinine, il opère une chromatographie descendante avec un mélange de collidine et d'alcool butylique secondaire. La créatinine est localisée en arrosant les bandes de papier avec du picrate alcalin. Pour la créatinine, les bandes sont chauffées à 110° pendant 3 heures; la mise en évidence de la créatinine formée se fait comme précédemment. Le R_f de la créatinine est généralement supérieur à celui de la créatine. D'ailleurs, la différence entre les valeurs R_f des 2 corps est suffisamment importante pour permettre l'identification de la créatine en présence de quantités considérables de créatinine. D'après MAW, dont le matériel biologique était l'urine de rat, la sensibilité de la méthode est de l'ordre du microgramme, tandis qu'AMES et RISLEY (4) admettent 11 microgrammes comme quantité limite décelable par leur technique qui s'inspire des travaux de MAW.

Il a été possible de faire de la chromatographie sur papier quantitative des corps créatiniques, soit par évaluation de la surface des taches colorées, soit par élution et dosage à l'aide d'une méthode éprouvée (4).

- C H A P I T R E I V -

=====

METHODES DE DOSAGE BASEES SUR UNE AUTRE REACTION QUE
LA REACTION DE JAFFE.

I.- METHODE AU DINITROBENZOATE.

La réaction au dinitrobenzoate (acide 3,5-dinitrobenzoïque + soude) a été découverte simultanément en 1936 par LANGLEY et EVANS (76) et par BENEDICT et BEHRE (12). Sur la réaction de JAFFE, elle a l'avantage d'une spécificité plus grande. La glycocyamine donne une coloration dont l'intensité est 1/7 de celle obtenue avec le picrate alcalin et l'hydantoïne donne une coloration plus faible encore. Le glucose en solution à 10 pour 100, le fructose en solution à 2 pour 100 et la créatine ne donnent pas de coloration. Vis-à-vis de l'acétone et de l'acide acétylacétique, ce réactif est moins sensible que le picrate alcalin. Dans le cas de l'acide acétylacétique, l'intensité de la coloration décroît avec le temps, tandis qu'avec l'acétone elle augmente progressivement. L'acide urique, le phénol, le crésol, le galactose, l'hydrogène sulfuré n'ont aucune influence.

Par contre, plus encore que dans la réaction de JAFFE, les facteurs tels que la concentration en alcali, la pureté des réactifs, la présence de sels de métaux alcalins (ClNa), le temps et la lumière ont une importance capitale (74). C'est ce qui rend cette méthode particulièrement délicate à appliquer.

L'acide 3,5-dinitrobenzoïque qu'on trouve maintenant plus facilement dans le commerce qu'à l'époque de la découverte de la méthode, nécessite une purification très soignée, car les impuretés qu'il renferme donnent une coloration analogue à celle qui caractérise la créatinine. BENEDICT et BEHRE (12) avaient prétendu que la coloration donnée par les filtrats sanguins était différente à la

fois par la teinte et par la stabilité de celle donnée par la solution pure de créatinine. Par conséquent, ces auteurs qui voyaient en cela une preuve supplémentaire de l'absence de la créatinine du sang, limitaient leurs dosages à l'urine. Mais BOLLIGER (16) devait montrer par la suite que l'acide 3,5-dinitrobenzoïque de BENEDICT et BEHRE n'avait pas été suffisamment purifié, les impuretés étant responsables des différences observées dans les colorations. Les valeurs trouvées par BOLLIGER et par LANGLEY et EVANS sur des défécats sanguins à l'aide du dinitrobenzoate, sont très inférieures à celles données par la réaction de JAFFE. Cependant, MILLER et DUBOS (84) avec des réactifs d'une grande pureté trouvent une bonne concordance entre les deux méthodes, ce qui est confirmé par BARAC et DELVENNE (6) dans le cas de l'urine. Néanmoins, ils préfèrent la réaction de JAFFE à celle au dinitrobenzoate dont la stabilité et la sensibilité sont moindres.

RÖTTGER (97) adopte la modification proposée par LEHNARTZ (78) qui veut qu'on ajoute, entre la solution de dinitrobenzoate et la soude, un peu de solution aqueuse d'acétate de sodium, afin de stabiliser rapidement la coloration. Mais MANDEL et JONES (81) n'ont pas pu remarquer d'effet stabilisant avec l'acétate; ils suivent la cinétique de la réaction au photomètre à 495 m μ et notent pour le calcul la densité optique la plus forte.

Enfin, CARR (26) affirme que l'addition d'acétate produit une diminution progressive de la densité optique durant les 30 premières minutes au lieu de la stabilité de 28 minutes annoncée par LEHNARTZ (78). Il décrit une technique qui tient compte des faits suivants:

a) la courbe d'absorption de la coloration montre un maximum assez étalé au voisinage de 500 m μ ;

b) la loi de BEER-LAMBERT s'applique pour des concentrations allant de 1×10^{-4} à 1×10^{-3} M de créatinine avec 0,025 M de dinitrobenzoate de sodium et 0,025 M de soude;

c) la température ambiante exerce une grande influence sur le développement de la coloration;

d) l'intensité de la coloration diminue au contact de l'air libre à cause de l'effet neutralisant du gaz carbonique contenu dans l'atmosphère; la stabilité est atteinte après 30 à 50 minutes de développement, mais ne se maintient pas longtemps. En effet, la stabilité est affectée par des changements irréversibles qui se font aux dépens du composé d'addition créatinine - dinitrobenzoate. Le composé nitré est réduit principalement en dérivé azoxy, tandis que la créatinine est oxydée en glyoxalate, oxalate et

autres produits. Concurrément, il y a introduction de groupements -OH dans le noyau aromatique du produit d'addition ce qui aboutit à la destruction du complexe et à la formation de nitrophénols probablement responsables de la coloration jaune qui apparaît, lorsqu'on laisse le mélange réactionnel au repos pendant un certain temps;

e) la pratique de diluer le liquide coloré avant la lecture n'est pas recommandable, parce que la densité optique diminue rapidement en liqueur diluée.

CARR trouve en définitive que la réaction de JAFFE est préférable, car elle est d'une sensibilité plus grande et d'une stabilité meilleure. De plus, le coefficient d'extinction maximum à $510\text{ m}\mu$ pour le complexe créatinino-picrique est de beaucoup supérieur à celui trouvé dans la méthode au dinitrobenzoate.

2.- METHODES BASEES SUR LA FORMATION D'UN COMPLEXE MERCURIQUE:

On sait depuis longtemps que la créatinine réduit le réactif de Nessler avec production d'un complexe instable et de mercure métallique.

En 1936, BARRETT (8) se sert d'un réactif de Nessler modifié pour caractériser la créatinine, que BARCLAY et KENNEY (7), en 1947 proposent de doser néphélométriquement à l'aide du réactif de BARRETT rendu plus spécifique. Cette méthode qui souffre des défauts inhérents à la néphélométrie, a été sévèrement critiquée par STELGENS, WOLF et SCHREIER (106) qui attirent l'attention sur la sédimentation rapide du complexe par suite de la forte densité du mercure. Ces auteurs proposent de lui substituer une méthode dont le principe est le suivant (105, 106): on ajoute un excès mesuré de thiocyanate de mercure et de potassium - obtenu par le mélange de chlorure mercurique et de thiocyanate de potassium en solution dans l'eau - et de la soude à une solution diluée de créatinine en contenant 15 microgrammes au maximum. Celle-ci se combine avec le complexe mercurique. Le mercure non combiné est dosé colorimétriquement par la dithizone.

De cette façon, STELGENS (104) a pu doser avec précision des quantités de créatinine comprises entre 1 et 15 microgrammes, ce qui permet de faire des dosages sur des quantités minimales de sang: 0,2-0,3 ml prélevés au bout du doigt.

Au sujet du mécanisme de la réaction, STELGENS et coll. (106) qui ont étudié comparativement le précipité obtenu

dans la méthode de BARCLAY et KENNEY, le précipité avec le thiocyanate de mercure et celui que donne le bichlorure de mercure, assurent que dans les trois cas la plus grande partie en est formée de mercure métallique, la créatinine étant transformée en isonitriles. La guanidine, l'urée, l'acide urique et l'ammoniac ne gêneraient pas. L'influence perturbatrice du glucose est éliminée par le choix judicieux des conditions de température et d'alcalinité qui, alors, permettent également d'opérer en présence de 30 fois plus de créatine que de créatinine sans qu'il y ait interférence.

Comme teneur normale en créatinine, cette méthode donne 7 à 11 mg par litre de sérum. Les dosages pratiqués sur l'urine montrent une bonne concordance avec la méthode picrique pour la créatinine, tandis que pour la créatine les divergences observées sont notables.

Disons pour conclure que cette méthode présente l'inconvénient d'être délicate et laborieuse sans donner plus de précision que n'en offrent les techniques récentes faisant appel à la si commode réaction de JAFFE.

3.- ESSAI DE MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DOSAGE DE LA CREATININE PAR LE FERRICYANURE EN MILIEU ALCALIN.

Dans une publication parue en 1926, HOLMES et HOLMES (63) affirmaient les propriétés réductrices de la créatine et de la créatinine vis-à-vis du ferricyanure alcalin, la créatinine étant plus fortement réductrice que la créatine. Nous pensions qu'il y avait là un point de départ possible pour l'établissement d'une nouvelle méthode de dosage des corps créatiniques dans les milieux biologiques.

A cet effet, nous avons étudié les conditions d'un dosage colorimétrique de la créatinine en faisant appel au bleu de Prusse formé à partir du ferrocyanure provenant de la réduction du ferricyanure.

Une des principales difficultés rencontrées réside dans l'instabilité de la coloration, due à la floculation du ferrocyanure ferrique. Les premiers colloïdes protecteurs utilisés pour retarder la floculation du bleu de Prusse furent la gomme arabique et la gomme-gutte. WOLF et DE LAVERGNE (114) ont employé la gélatine. FONTY (41), de son côté, a proposé l'emploi de la polyvinylpyrrolidone.

A la suite de HERBAIN (61) nous avons d'abord essayé

de trouver des conditions de dilution du bleu telles qu'il n'y ait pas floculation immédiate, chose difficile à réaliser, la stabilité du bleu colloïdal étant assez précaire, surtout en présence des agents chimiques utilisés pour déféquer le sang. Parmi les colloïdes protecteurs qui agissent également sur la viscosité du milieu, nous avons utilisé successivement des concentrations variables de polyvinylpyrrolidone (Subtosan Spécia) et de Tween 80, substances organiques, dont le pouvoir réducteur propre est trop notable pour donner des résultats acceptables.

Nous avons alors eu connaissance des travaux de PLUMEL (91) qui propose de séparer le bleu de Prusse par centrifugation, puis de le dissoudre dans une solution d'acide oxalique. Nos essais ont échoué par suite de la difficulté qu'il y a de recueillir quantitativement le précipité de bleu de Prusse. D'ailleurs, PLUMEL lui-même semble avoir abandonné cette technique, et nous avons fait des essais avec celle qu'il lui a substituée pour effectuer son microdosage colorimétrique des oses (92) où il a remplacé, entre autres, l'acide oxalique par le fluorure de sodium.

L'action stabilisante du fluorure aussi bien que de l'acide oxalique peut s'expliquer par la formation de complexes avec le ferrocyanure ferrique, de sorte qu'on obtient une pseudosolution stable. La quantité de fluorure de sodium ajoutée correspond à la formation du complexe $(FeF_6)^{-}$. D'après PLUMEL, le fluorure de sodium, tout en complexant le fer ferrique, entrave aussi son adsorption sur les grains du colloïde, cause habituelle de la floculation. Nous avons observé que la stabilité n'est pas absolument parfaite, mais que la coloration évolue toujours parallèlement dans des essais à blanc et dans les solutions de créatinine. Le complexe ferrofluoré ne laisse pas précipiter d'hydroxyde ferrique à un pH inférieur à 4,4; en opérant vers pH 4, le développement de la coloration bleue se fait dans de bien meilleures conditions de régularité et de stabilité qu'en milieu plus acide.

PLUMEL (92) préconise d'additionner le réactif au ferricyanure d'une petite quantité de ferrocyanure, "afin que le seuil de formation du bleu de Prusse soit dépassé dans les blancs". A notre avis, il y a là une perte de sensibilité, et nous avons supprimé le ferrocyanure dans nos essais. En outre, nous avons omis l'addition, à la solution de fluorure, d'acétate de sodium nécessaire, selon PLUMEL, pour tamponner le pH en milieu acide, afin d'éviter les légers écarts individuels et de régulariser le développement de la coloration. Ces remarques nous semblent surtout valables lorsqu'on travaille sur des filtrats de défécation et sur l'urine; en solution pure, les variations

de pH sont négligeables.

Voici le mode opératoire tel que nous l'avons mis au point: dans des tubes à essai, de préférence calibrés, on répartit des quantités croissantes d'une solution diluée de créatinine, par exemple: 0, 1, 2, 3, 4, 5 ml d'une solution M/10000 (1 ml contient $11,3\mu$ g de créatinine). On ajoute 1 ml de solution alcaline de ferricyanure de potassium contenant 0,66 g de ferricyanure cristallisé et 1,06 g de carbonate de sodium anhydre dans 100 ml. On complète, si nécessaire, à 6 ml avec de l'eau bidistillée et on place les tubes au bain-marie à 100° pendant 10 minutes exactement. Ensuite, on les plonge durant 5 minutes dans la glace fondante et on ajoute dans tous les tubes 1 ml de solution aqueuse de fluorure de sodium à 1,26 g pour 100, puis 2 ml de solution d'alun de fer qui renferme 1,2 g d'alun de fer et 13,75 ml d'acide sulfurique normal dans 100 ml. Finalement, on complète à 10 ml avec de l'eau bidistillée et on mélange par agitation. La lecture se fait au spectrophotomètre à la longueur d'onde de $640 m\mu$ après 45 minutes de repos à la température du laboratoire.

Pour ses lectures, PLUMEL se sert d'un écran rouge moyen Chance L. R02. Nous avons précisé la longueur d'onde optimum ($640 m\mu$) avec un spectrophotomètre Coleman Junior où divers essais à des longueurs d'onde variables ont montré, d'une part, un minimum de densité optique entre 550 et $640 m\mu$ pour le ferricyanure alcalin et, d'autre part, une valeur maximum, sensiblement constante, de la densité optique entre 600 et $700 m\mu$ pour la coloration bleue du ferrocyanure ferrique.

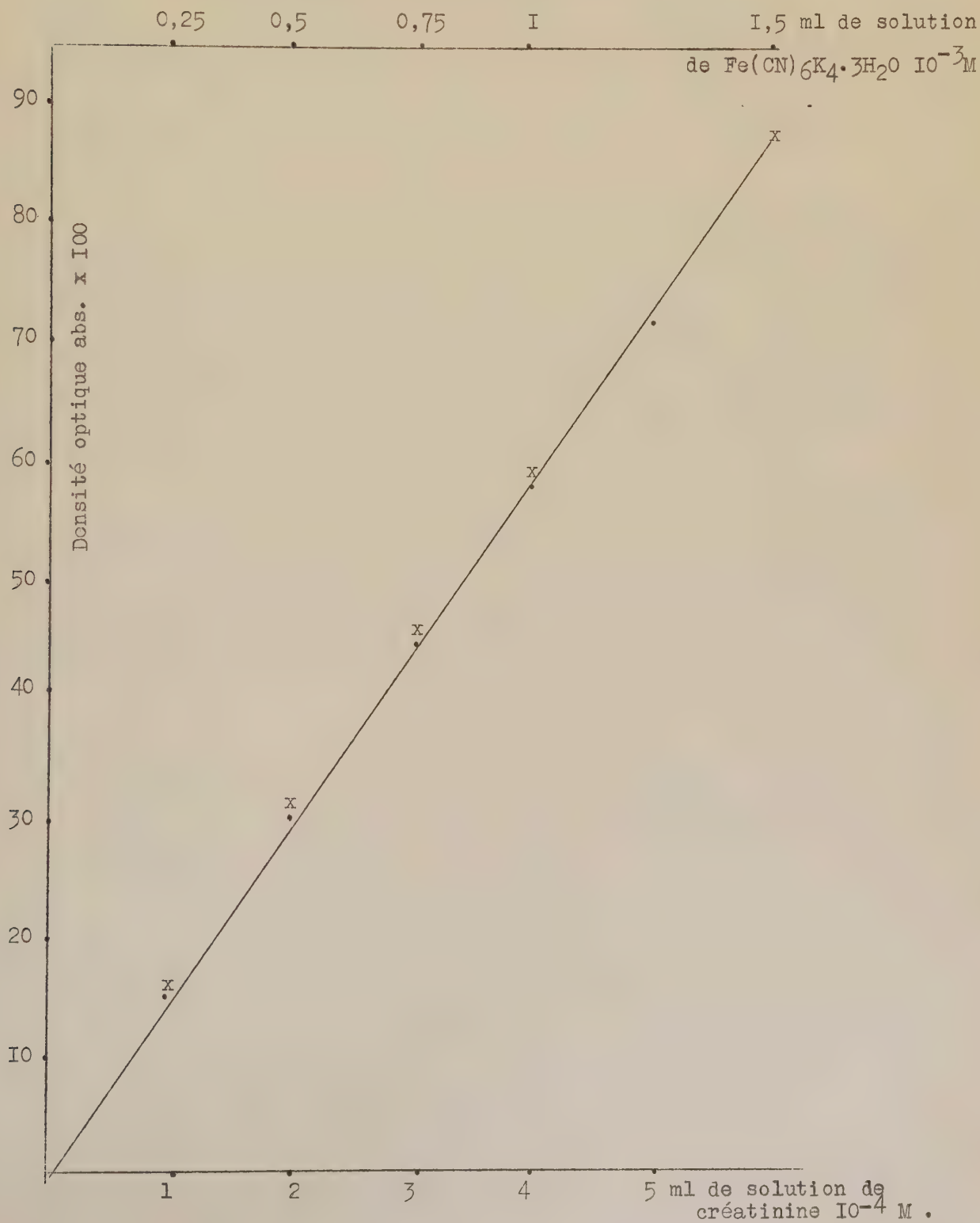
La substitution du fluorure par l'acide oxalique n'est pas favorable, car si la coloration se stabilise rapidement au début, les essais à blanc sont trop foncés. De plus, on observe une précipitation qui s'amorce au bout d'une heure et qui est totale après une journée, chose qui ne se produit pas avec le fluorure. Ce phénomène s'explique aisément par les propriétés réductrices de l'acide oxalique.

La représentation graphique (graphique n° 6) montre qu'on obtient une droite passant par l'origine; la loi de BEER-LAMBERT se trouve donc vérifiée pour les concentrations envisagées, c'est-à-dire qu'un dosage de créatinine par la colorimétrie du bleu de Prusse pour des prises d'essai comprises entre 0 et $56,5\mu$ g (jusqu'à 1 mg/100 ml) est correct en solution pure. Dans ces conditions, l'oxydation de 1 molécule de créatinine correspond à la réduction de 2,5 molécules environ de ferricyanure; nous avons établi ce rapport en comparant la suspension de bleu de Prusse obtenue avec la créatinine à celle obtenue avec une solu-

GRAPHIQUE N° 6.

COLORIMETRIE DU BLEU DE PRUSSE FORME PAR OXYDATION D'UNE SOLUTION TITREE DE CREATININE (—•) ET A PARTIR D'UNE SOLUTION TITREE DE FERROCYANURE (x—x).

Photocolorimètre Coleman Junior; $\lambda = 640 \text{ m}\mu$.

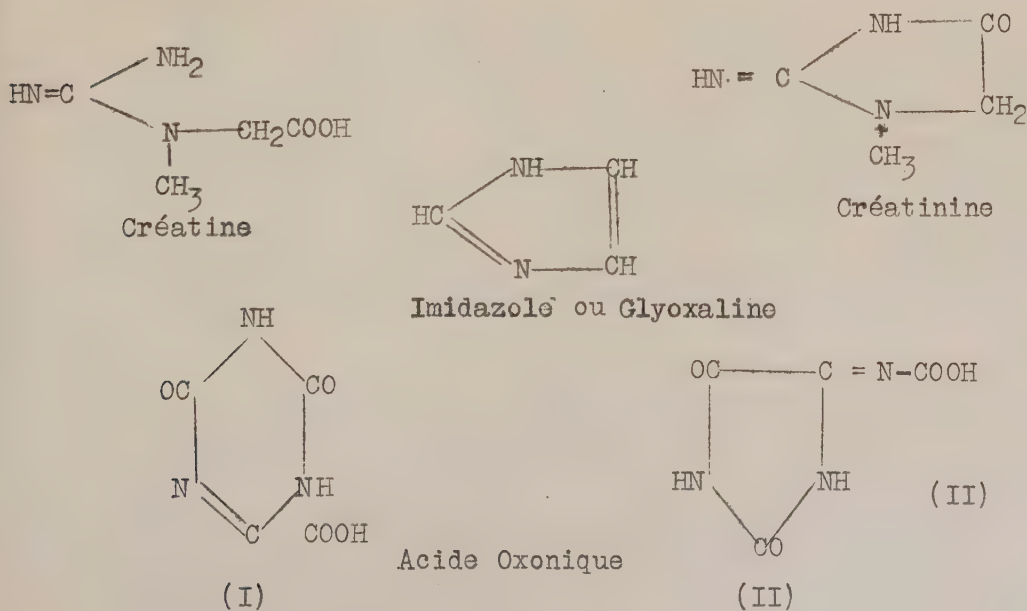


tion 0,001 M de ferrocyanure de potassium (graphique n° 6).

Songeant à l'application possible de cette technique aux liquides biologiques, nous avons voulu voir si d'autres substances étaient oxydées dans les mêmes conditions et comment, éventuellement, on pourrait les éliminer. Ainsi, la créatine s'est révélée 5 fois moins réductrice que la créatinine, la glycocyamidine 2 fois moins seulement, tandis que la glycocyamine ne réduit pas du tout le ferricyanure alcalin. Par contre, l'acide urique est sensiblement plus réducteur que la créatinine, puisque 1 molécule de ce corps correspond à 3,5 molécules de ferrocyanure (la créatinine ne correspondant qu'à 2,5 molécules).

Les corps qui réduisent facilement le ferricyanure et que nous venons de mentionner, possèdent tous un cycle qui s'apparente au noyau imidazole. Nous avons réussi à montrer que d'autres corps à noyau imidazole étaient aussi facilement oxydés par le ferricyanure dans nos conditions expérimentales; tels sont: l'histamine, l'histidine, la pilocarpine, la naphtyl-méthyl-imidazoline (Privine), la benzyl-imidazoline (Priscol). Peut-on penser que parmi les corps qui ne sont pas des réducteurs caractérisés (aldéhydes, mercaptans par exemple), la présence du noyau imidazole est nécessaire pour réduire le ferricyanure alcalin?

L'acide oxonique est un dérivé de l'acide urique facile à préparer (2I); on lui attribue une formule triazinique (I) (2I,25); nous avons observé qu'il ne réduit pas le ferricyanure alcalin. C'est, à notre avis, un argument de plus pour penser que la formule imidazolique (II), qu'on avait antérieurement attribuée à l'acide oxonique, était incorrecte.



Nous avons dès lors pensé que le faible pouvoir réducteur de la créatine - corps non imidazolique - est dû à sa transformation partielle en créatinine au cours du chauffage. Cette opinion est corroborée par le fait qu'en limitant le temps de chauffage à 2 minutes, la créatine n'agit plus guère sur le ferricyanure, alors que la créatinine agit encore fortement (graphique n° 7).

L'application de ces remarques au dosage colorimétrique de la créatinine dans le sang et dans l'urine n'a malheureusement pas abouti, car nous n'avons pas réussi à supprimer complètement l'influence gênante de substances réductrices telles que le glucose, l'acide urique, les bases puriques, le glutathion, pour ne citer que les plus importantes. Pour éliminer ces chromogènes de l'urine et du sang, nous avons essayé l'action de divers agents de défécation: hydrates de zinc, de cadmium, sels de métaux lourds tels que l'acétate neutre (réactif de Courtonne) et l'acétate basique de plomb, le nitrate mercurique (réactif de Patein et Dufau); nous avons essayé aussi la précipitation de l'acide urique sous forme d'urate d'argent et la précipitation du bloc xantho-urique par le procédé de Haycraft-Denigès; l'oxydation par l'iode en milieu légèrement acide (109), aussi bien qu'en milieu bicarbonaté (méthode de Hopkins-Ronchèse), l'oxydation par les sels cériques (73). D'une manière générale, les résultats ont été décevants à cause de la multiplicité des chromogènes à éliminer et de l'influence souvent néfaste des réactifs employés sur la formation du bleu de Prusse.

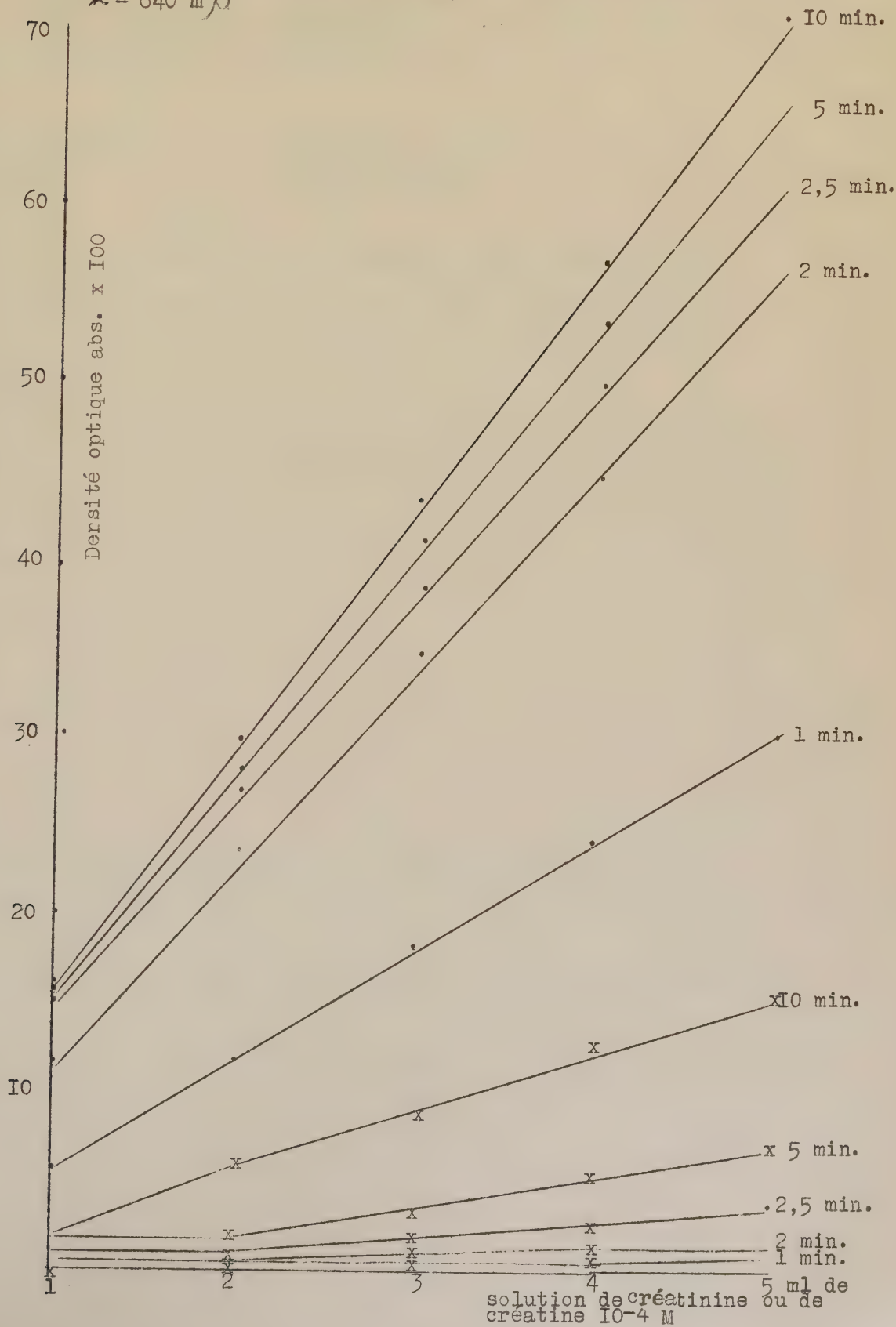
Enfin, nous avons quelque espoir d'arriver à une adsorption ou à une élution sélective de la créatinine urinaire et sanguine grâce à l'emploi de réactif de LLOYD, de kaolin ou d'argiles montmorillonitiques. Les difficultés rencontrées ici tenaient aux impuretés réductrices contenues dans l'adsorbant, très difficiles à enlever complètement, ainsi qu'au manque de sélectivité dans l'adsorption et dans l'élution. En effet, comme nous l'avons déjà annoncé au chapitre III (p. 43), les conditions de fixation de la créatinine sont telles que celle-ci se trouve toujours accompagnée d'une certaine quantité d'acide urique.

De plus, nous avons observé, à l'aide du réactif phosphotungstique de FOLIN, que l'élution de l'acide urique urinaire, fixé sur le réactif de LLOYD, augmente également avec le pH, mais qu'elle atteint rapidement un maximum vers pH 9, valeur au-delà de laquelle la quantité éluee tend à diminuer de nouveau légèrement. Contrairement à ce qui se passe pour la créatinine, l'élution de l'acide urique n'est jamais totale; d'après les densités

GRAPHIQUE N° 7

INFLUENCE DE LA DUREE DE CHAUFFAGE SUR L'OXYDATION DE CREATININE (•—•) ET DE LA CREATINE (x—x) PAR LE FERRICYANURE.

$\lambda = 640 \text{ m}\mu$



optiques relevées dans le tableau I, on voit que le pourcentage d'acide urique élué ne dépasse pas 30 pour 100 de la quantité totale mise en expérience. Le dosage spécifique de la créatinine par le ferricyanure devient donc illusoire.

- TABLEAU N° I -
=====

ELUTION, EN FONCTION DU pH, DE L'ACIDE
URIQUE URINAIRE FIXE SUR LE REACTIF DE
LLOYD

Densité optique abs. x 100 lue à 640 mμ après adsorption sur	
pH	Réactif de LLOYD
7	1,9
8	3,8
8,9	4,9
10	4,3
Témoin	15

- C H A P I T R E V -
=====

APPLICATION DES PROPRIETES ADSORBANTES DE LA MONTMORILLONITE
AU DOSAGE DE LA CREATININE.

I.- GENERALITES SUR LA MONTMORILLONITE:

L'étude du réactif de LLOYD vient de nous révéler que cet adsorbant est loin d'être parfait. De plus, il ne se trouve pas en France (X). Voilà pourquoi nous avons eu l'idée d'essayer la montmorillonite qui avait déjà été étudiée sous différents aspects dans le laboratoire où nous travaillions. Nous allons résumer ici l'essentiel de notre travail expérimental dont les justificatifs seront exposés p. 60. Rappelons d'abord quelques notions sur la montmorillonite empruntées à BLOCH (15).

La montmorillonite (désignée parfois par le symbole Mt), comme d'ailleurs d'autres minéraux argileux, est formée par des feuillets plus ou moins régulièrement empilés. Chaque feuillet de montmorillonite est formé par la répétition de mailles cristallines de formule approximative $[\text{Si}_4\text{Al}_2\text{O}_{10}(\text{OH})_2]_2$. La maille est formée de 7 couches atomiques superposées. Les couches externes sont constituées par l'enchaînement de tétraèdres (SiO_4). La couche médiane contient des ions $(\text{Al})^{+++}$; certains atomes d'oxygène sont remplacés, à l'intérieur des feuillets, par des ions hydroxyles.

Dans les produits naturels, les ions $(\text{Si})^{+++}$ des couches tétraédriques peuvent être remplacés par des ions $(\text{Al})^{+++}$; dans les octaèdres de la couche médiane, les ions $(\text{Al})^{+++}$ sont partiellement remplacés par des ions $(\text{Fe})^{+++}$, $(\text{Fe})^{++}$ ou $(\text{Mg})^{++}$. Ces remplacements isomorphiques entraî-

(X) Nous remercions bien vivement la firme Eli LILLY (U.S.A.) qui nous a fait parvenir du réactif de LLOYD. Cela nous a permis de comparer la montmorillonite au réactif de LLOYD.

nent un défaut de charges positives qui peut être compensé par l'adsorption, à la surface des feuillets de cations minéraux ou organiques, phénomène qui rend possible la fixation des cations. Dans les montmorillonites typiques, l'excès des charges négatives résulte principalement du remplacement de $(\text{Si})^{++++}$ par $(\text{Al})^{+++}$.

Ce bref aperçu sur la structure de la montmorillonite nous permettra de discuter le mécanisme de fixation d'une base organique telle que la créatinine.

Nos premiers essais ont été faits avec de la montmorillonite pure telle qu'elle est obtenue par la méthode de BLOCH (15), où on part d'une bentonite naturelle, la terre de Taourirt, d'origine marocaine, qui contient, à côté de montmorillonite pure, des oxydes de fer, du mica, de la silice, des carbonates et une certaine quantité de matières humiques. Le traitement comporte d'abord l'élimination des particules les plus grossières et les plus fines par supercentrifugation; ensuite, l'oxydation de la matière organique par le perhydrol et finalement une électrodialyse qui a pour but d'enlever les carbonates insolubles et les ions qui saturent la montmorillonite dans le minéral brut.

Le produit ainsi obtenu est la montmorillonite acide (Mt-H); elle est hygroscopique et il est commode de la conserver à l'étuve à 105° .

Un traitement de Mt-H par une quantité déterminée de soude donne naissance à la montmorillonite sodique ou Mt-Na.

Agitant des solutions aqueuses neutres de créatinine de concentration variable avec des quantités variables de Mt-H et de Mt-Na, nous avons pu constater que la dernière ne fixait que très peu de créatinine, tandis que sur la première, ce corps était fixé en proportion variable. Nos efforts se sont alors portés principalement sur Mt-H, dont une même quantité fixe une proportion de plus en plus grande à mesure qu'on diminue la quantité totale de créatinine offerte à l'argile. L'expérience inverse montre que l'adsorption augmente d'abord avec la quantité d'adsorbant pour atteindre ensuite un maximum.

Dans cet ordre d'idées, nous pouvons préciser que si on offre un excès, par exemple 0,02 g de créatinine à 1 g de Mt-H, il s'en fixe au maximum 0,01 g; par conséquent, pour que la fixation soit toujours de 100 pour 100, la quantité de créatinine à offrir à 1 g de Mt-H doit être inférieure ou égale à 0,01 g, condition qui est respectée dans toutes les récentes techniques de dosage par adsorp-

tion-élution.

Avec le mode opératoire indiqué pour le réactif de LLOYD par HARE (53) (2 ml de liquide contenant jusqu'à 10 μ g de créatinine sont agités avec 0,02 g d'argile en présence de 0,2 ml de solution saturée d'acide oxalique) et celui développé par OWEN et coll (87) (v.p.60), les résultats trouvés sur l'urine à l'aide du réactif de LLOYD et de Mt-H ont été concordants.

Ce résultat encourageant nous a incité à voir si d'autres argiles montmorillonitiques, faciles à trouver dans le commerce, seraient susceptibles de remplacer Mt-H dont la préparation est longue et laborieuse.

Les essais faits avec la terre de Taourirt et la bentonite Prolabo, employées dans les conditions ci-dessus, nous ont montré la nécessité d'un traitement acide préalable ayant pour effet de transformer Mt neutralisée par des cations naturels en Mt-H, seule active. En outre, les bentonites commerciales renferment souvent des quantités notables de carbonates qui gênent, parce qu'ils diminuent l'acidité effective du milieu, facteur dont nous allons voir l'importance.

Pour obtenir Mt-H convenant à nos besoins à partir des produits commerciaux ou naturels, il suffit d'agiter 1/2 heure la suspension d'argile dans un excès d'acide chlorhydrique 0,1 n. Après une nuit de repos, centrifuger; laver le culot à plusieurs reprises avec de l'eau, sécher à l'étuve à 105°, pulvériser et conserver en flacons bien bouchés.

En ce qui concerne l'influence du pH sur la fixation de la créatinine, nous avons établi que la terre de Taourirt traitée par l'acide chlorhydrique, et Mt-H pure, fixent la totalité de la créatinine offerte entre pH 1,1 et 6,8. Dans les mêmes conditions, la fixation sur le réactif de LLOYD n'est totale que jusqu'à un pH inférieur ou égal à 2 (v.p.62 et tableau II). Des résultats analogues ont été obtenus avec une dilution urinaire dont le pH varie entre 0,9 et 6,8 (v. p.64 et tableau III), ainsi qu'avec un défécât tungstique de sérum sanguin dont le pH varie entre 2 et 6,8 (v.p.65 et tableau IV).

Etudiant les conditions d'élution de la créatinine, nous avons remarqué que l'élution est complète à partir de pH 9 pour les 50 μ g fixes sur de la terre de Taourirt traitée à l'acide chlorhydrique, alors qu'avec le réactif de LLOYD, ceci n'est le cas qu'à partir de pH 10 (v.p.67 et tableau V).

Pour prouver plus amplement les avantages présentés par les argiles montmorillonitiques, il faut montrer que vis-à-vis des substances qui gênent la réaction de JAFFE dans les milieux biologiques, leur activité est au moins comparable à celle du réactif de LLOYD dont la spécificité se trouve d'ailleurs quelque peu entamée à la suite de recherches récentes, comme nous l'avons vu. C'est ainsi que nous avons été amené à vérifier l'efficacité des argiles montmorillonitiques dans l'élimination de chromogènes non-créatininiques, tels que le glucose, l'acétone et l'acide pyruvique, en opérant sur des solutions aqueuses de ces substances ajoutées en quantités croissantes à une solution aqueuse de créatinine, d'une part, et à du sérum sanguin, d'autre part. L'emploi de la terre de Taourirt et de la bentonite Prolabo traitées par l'acide chlorhydrique, permet de doser correctement la créatinine sérique en présence de 10 g pour 1000 de glucose, de 1 g pour 1000 d'acétone et de 0,04 g pour 1000 d'acide pyruvique. Ces résultats ont été confirmés par quelques dosages sur des sangs pathologiques (diabète, choc cardiazolique). (v.p.73 et tableaux X - XIII).

2.- MECANISME DE LA FIXATION DE LA CREATININE SUR L'ADSORBANT.

L'étude de cette question est si complexe qu'elle nécessite pour être traitée correctement, un cadre qui dépasse largement celui du présent travail. Aussi nous limiterons-nous à quelques indications générales, renvoyant pour plus de détails à la thèse, en cours de rédaction, de notre camarade A. HAXAIRE (60), que nous remercions ici des renseignements qu'il nous a aimablement fournis.

La fixation de la créatinine sur Mt-Na a été étudiée par HAXAIRE, qui a observé que 35,5 méq de créatinine, en solution aqueuse à pH 7, sont fixés par 100 g de Mt-Na et déplacent 25,9 méq de sodium. La sorption, sur les argiles acides (Mt-H) ou sur le réactif de LLOYD, peut procéder par échange de bases ou encore par adsorption; dans le premier cas, chaque ion créatininium fixé devrait libérer un ion hydrogène de Mt-H, mais la vérification en est impossible. La fixation de la créatinine n'est pas labile comme c'est le cas pour les colorants anioniques qui s'éluent par simples lavages répétés à l'eau. L'élution de la créatinine ne se fait pas, même si on remplace l'eau par une solution de chlorure de sodium.

A l'heure actuelle, nous ne pouvons choisir entre les deux mécanismes de fixation qui, d'ailleurs, ne s'excluent pas l'un l'autre.

3.- EXPERIENCES JUSTIFIANT L'EMPLOI DE LA MONTMORILLONITE DANS LE DOSAGE DE LA CREATININE. APPLICATIONS EN CLINIQUE:

A.- REACTIFS ET METHODES DE DOSAGE EMPLOYES:

Comme adsorbant, nous employons Mt-H, la terre de Taourirt et la bentonite Prolabo, ces dernières ayant subi un traitement préalable par l'acide chlorhydrique.
(v.p. 58)

Nous avons d'ailleurs pu constater que Mt-H et la terre de Taourirt acidifiées ont sur la bentonite Prolabo acidifiée l'avantage de se laisser mettre plus facilement en suspension dans le picrate alcalin.

Le réactif picratosodique se prépare en versant 5,5 ml de soude 2,5 n dans 27,5 ml de solution saturée d'acide picrique; compléter à 100 ml avec de l'eau distillée (87).

La créatinine est conservée sous forme de solution stock à 0,1 g pour 100 dans l'acide chlorhydrique 0,1 n; on dilue, généralement à 1/100, au moment du besoin.

Nous employons la méthode suivante, qui est celle d'OWEN et coll. (87) transposée au cas de Mt-H. Nous avons choisi ce mode opératoire, inspiré d'ailleurs de celui décrit par HAUGEN et BLEGEN (57), parce qu'il résulte d'une étude critique très approfondie des méthodes qui font appel à la réaction de JAFFE; en outre, il présente sur la technique de HARE (53), l'avantage d'être moins délicat à exécuter.

Dans un tube à centrifuger conique, on verse une portion aliquote de défécât sérique ou de dilution urinaire convenable. La défécation est celle de BROD et SIROTA (22), où l'on mélange 2 volumes de sérum, 3 volumes d'eau, 1 volume de tungstate de sodium à 10 pour 100 et 2 volumes d'acide sulfurique 0,66 n; après 30 minutes de repos, on centrifuge. La dilution de l'urine est fonction de la teneur en créatinine; le volume d'urine émis en un temps déterminé peut en donner une idée; généralement,

elle est de 1/200. On complète, le cas échéant, à 5 ml par addition d'eau et on ajoute 100 mg d'adsorbant. Des essais nous ont prouvé que la quantité d'adsorbant peut varier de 10 pour 100, sans que le résultat en soit affecté. Pour plus de commodité, on peut même se servir d'une petite mesure en forme de cuiller, procédé recommandé par LØKEN (80).

Nous avons supprimé l'addition d'acide oxalique, ce qui se comprend aisément après ce que nous venons de dire sur la fixation de la créatinine en fonction du pH. (v.p.58 et le détail, p.62). On agite, de façon à bien mettre en suspension l'adsorbant dans le liquide, opération qui est répétée 2 à 3 fois durant les 10 minutes de contact. On centrifuge à grande vitesse pendant 10 minutes environ, on décante le liquide surnageant qui doit être limpide et on retourne le tube sur un papier filtre jusqu'à absorption totale du liquide résiduel; on peut encore essuyer les parois internes du tube avec du papier filtre.

Le liquide surnageant le culot est parfois opalescent; on pouvait donc craindre que l'argile restée en suspension ne soustraie au dosage des quantités appréciables de créatinine. D'autre part, on pouvait se demander si la fixation de la créatinine est bien totale. L'ultrafiltration du liquide épuisé par l'argile nous a permis de l'affirmer, mais nos expériences sur la fixation de la créatinine à différents pH nous avaient déjà montré implicitement que tel était le cas (v. p. 62).

Pour le dosage proprement dit, on ajoute dans le tube conique 7,5 ml de réactif picratosodique fraîchement préparé. À l'aide d'un agitateur, le culot est mis en suspension. Après 10 minutes de repos, on centrifuge pendant 10 minutes à grande vitesse. Le liquide coloré est décanté dans un tube qui sera placé au bain-marie à 20° jusqu'à équilibre de température, ce qui est réalisé au bout de 10 minutes environ. La lecture se fait à 520 m μ . Parallèlement, on fait un essai à blanc et des témoins avec des quantités croissantes et convenablement choisies de créatinine, par exemple 5. 10, 15. 20 μ g (=0.5 I, 1,5, 2 ml de la solution stock diluée à 1/100.), traités de la même manière pour pouvoir construire la courbe d'étalonnage qui servira à déduire la teneur en créatinine de la prise d'essai. Tous les essais sont faits en double.

B.- FIXATION DE LA CREATININE SUR LA MONTMORILLONITE EN
FONCTION DU pH.

Au cours des quelques essais préliminaires, nous avons appliqué les techniques de HARE (53) et d'OWEN (87) dans les conditions d'acidité indiquées par ces auteurs. Mais, puisque Mt-Na fixe très mal la créatinine, alors que Mt-H la fixe bien, c'est que le pH joue un rôle important dans ce phénomène. Nous nous sommes alors rendu compte que l'acide oxalique, que les auteurs faisaient ajouter dans leurs méthodes basées sur l'emploi du réactif de LLOYD, était destiné à amener le pH à une valeur convenable; FOLIN et SVEDBERG (39) avaient d'ailleurs publié qu'on pouvait également se servir dans ce but d'acides forts comme l'acide sulfurique ou d'acides faibles, mais que ces derniers pouvaient décomposer un peu de réactif de LLOYD donnant un sel de calcium soluble qui gêne la réduction de la liqueur cuivrique lors du dosage du glucose dans l'urine à l'aide du réactif de FOLIN. L'acide oxalique ne présente pas cet inconvénient.

Notre projet était alors de voir si, à des valeurs progressivement croissantes du pH, la quantité de créatinine fixée à partir d'une solution aqueuse, d'une dilution urinaire et d'un défécât sérique restait la même.

a) SOLUTION AQUEUSE DE CREATININE:

Suivant la technique d'OWEN et coll. exposée ci-avant, 5 ml de solution de créatinine, contenant 50 μ g de cette substance, sont amenés à des pH variables et agités avec 0,1 g d'adsorbant. Les solutions de créatinine ont été ajustées par addition d'acide chlorhydrique, en s'aidant d'un pH-mètre HEITO, aux pH suivants:

1,1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 6,8. Après fixation, la créatinine est dosée par élution du culot d'argile. Afin de pouvoir évaluer la quantité de créatinine fixée par l'adsorbant aux différents pH, nous dosons dans les mêmes conditions, mais sans passer par l'adsorption, la créatinine sur une prise d'essai identique (= témoin).

D'un autre côté, les essais à blanc présentent des densités optiques qui ne varient pas sensiblement en fonction du pH; c'est pourquoi il suffit d'un essai à blanc par série.

- T A B L E A U N° II -

FIXATION DE LA CREATININE EN SOLUTION PURE SUR
DIFFERENTES ARGILES EN FONCTION DU pH

Densité optique abs. x 100 lue à 520 m μ après adsorption sur			
pH	R. LLOYD	Mt-H	Taourirt acidifiée
1,1	13,1	13,1	13,2
2	13	12,9	13
3	11	12,8	13,1
4	6	12,9	12,8
5	5,6	12,7	13
6	5,3	12,8	13
6,8	5,2	12,8	12,9
Témoin	12,8		

Résultats (tableau II)

Les 50 μ g offerts sont fixés par Mt-H et la terre de Taourirt traitée par l'acide chlorhydrique, quelle que soit la valeur du pH entre 1 et 7. Par contre, le réactif de LLOYD ne fixe toute la créatinine présente que si le pH est inférieur ou égal à 2. A pH 6,8, la quantité fixée ne représente que 40 pour 100.

Nous avons observé qu'avec un réactif de LLOYD traité auparavant par l'acide chlorhydrique, à la manière des argiles montmorillonitiques, la fixation de la créatinine devient également indépendante du pH entre 1 et 7.

b) DILUTION URINAIRE.

Nous opérons sur 5 ml d'urine diluée à 1/250, et amenée par addition d'acide chlorhydrique aux pH suivants:

0,9 ; 2 ; 3 ; 4,1 ; 5 ; 6 ; 6,8.

- T A B L E A U N° III -
=====

FIXATION DE LA CREATININE URINAIRE SUR DIFFERENTES
ARGILES EN FONCTION DU pH.
=====

Densité optique abs. x 100 lue à 520 m μ après adsorption sur			
pH	R. LLOYD	Mt-H	Taourirt acidifiée
0,9	10,6	II	II
2	10,5	10,8	10,9
3	9,5	10,8	II,I
4,1	6,8	II	10,8
5	6,2	II	10,9
6	5,8	II	II,I
6,8	5,8	10,7	10,9
Témoin	II,2		

Résultats (tableau III)

La fixation de la créatinine urinaire sur les argiles montmorillonitiques est indépendante du pH; elle est toujours complète, tandis que pour le réactif de LLOYD, cela ne vaut que jusqu'à pH 2 inclusivement. A pH 6,8, il n'y a plus que 52 pour 100 de fixés.

Le réactif de LLOYD, que nous avons soumis à l'action de l'acide chlorhydrique, fixe toute la créatinine, indé-

pendamment du pH.

c) DEFECAT SERIQUE:

Cette expérience se fait sur 5 ml de filtrat tungstique I/4 préparé à partir d'un sérum de veau. Les valeurs de pH étudiées sont: 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6,1 ; 6,8 (2 étant le pH du filtrat tel quel). L'ajustement au pH voulu se fait à l'aide de soude.

- T A B L E A U N° IV -

FIXATION DE LA CREATININE SERIQUE SUR DIFFERENTES ARGILES
EN FONCTION DU pH.

Densité optique abs. x 100 lue à 520 m μ après adsorption sur			
pH	R. LLOYD	Mt-H	Taourirt acidifiée
2	10,4	11	10,2
3	10,3	10,8	10
4	9,6	10,9	9,9
5	7	10,8	9,9
6,1	5,3	10,8	9,7
6,8	4,5	10,6	9,6
Témoin		10,8	

Résultats (tableau IV)

Comme précédemment, Mt-H et terre de Taourirt traitée par l'acide chlorhydrique ne sont pas influencées par le pH lors de la fixation de la créatinine sérique, fixation qui est toujours intégrale. Avec le réactif de LLOYD cependant, on n'arrive au même résultat que si le pH est inférieur ou égal à 3; à pH 6,8, il se fixe seulement 41,7 pour 100. L'action préalable de l'acide chlorhydrique sur le réactif de LLOYD rend la fixation indépendante du pH.

La conclusion importante qui s'impose est la suivante: les argiles montmorillonitiques convenablement préparées ont sur le réactif de LLOYD l'avantage indéniable d'une adsorption de créatinine également bonne pour toutes les valeurs de pH inférieures ou égales à 7. Rappelons, que si le pH du milieu est suffisamment acide, l'addition d'acide oxalique (ou de tout autre acide) est inutile pour obtenir une adsorption quantitative de la créatinine sur le réactif de LLOYD commercial; le pH convenable est aux environs de 2. Or, le pH des filtrats tungstiques 1/4, préconisés par BROD et SIROTA (22), est compris entre 2 et 2,2; celui des filtrats trichloracétiques employés par HARE (53) est légèrement inférieur. De toute façon, on se trouve donc dans les conditions favorables à une fixation intégrale de la créatinine sanguine. Pour l'urine, par contre, mis à part les cas où la présence d'albumine peut donner lieu à une défécation, l'acide oxalique est nécessaire à une bonne adsorption de la créatinine. L'emploi du réactif de LLOYD "activé" par l'acide chlorhydrique, comparable aux argiles montmorillonitiques quant à la fixation indépendante du pH, ne nous a cependant pas donné satisfaction pour doser la créatinine sérique. les résultats trouvés étant trop forts. (tableau VII, p.70).

Comme nous l'avons déjà signalé, les expériences de fixation en fonction du pH prouvent en même temps que l'adsorbant fixe toute la créatinine qui lui est offerte.

Il apparaît aussi que les argiles adsorbantes "tamponnent" le milieu réactionnel, de sorte que la réaction de JAFFE, très sensible aux variations de pH, se développe dans des conditions qui se rapprochent de la solution pure.

C.- ELUTION DE LA CREATININE FIXEE PAR DES SOLUTIONS D'ALCALINITE CROISSANTE. -----

Le but de cette étude était l'élution sélective de la créatinine urinaire et sérique en vue d'un dosage par colorimétrie du bleu de Prusse, dosage qui comporte une importante erreur par excès, lorsqu'il est pratiqué directement sur l'urine ou le défécât sérique.

A cet effet, nous avons réalisé des solutions-tampons aux pH suivants:

7,2 ; 8,2 ; 9,2 ; 10 ; 10,9 , par le mélange, en proportions variables, d'une solution de soude et d'une solution d'acide borique; le pH de 7,2 a été obtenu par le mélange d'une solution de borate de soude avec une solution

d'acide borique. Nous avons également fait des essais avec de l'eau distillée fraîchement bouillie, dont le pH est de 6,5.

Après avoir fixé 50 μ g de créatinine en solution aqueuse sur 0,1 g de terre de Taourirt acidifiée, les culots sont élués 3 fois avec 5 ml de solution-tampon. Les 15 ml d'éluat sont ultrafiltrés sur appareil de Breitenbach muni d'une membrane de porosité ultrafine. Cette membrane est ensuite lavée avec 5 ml d'eau distillée à pH 6,5 et on ajuste le volume final à 20 ml. L'absence de particules en suspension a été vérifiée dans chaque ultrafiltrat par l'épreuve de l'effet Tyndall.

Les 20 ml de liquide sont alors additionnés de 1,7 ml de soude à 10 pour 100 et de 8,3 ml de solution saturée d'acide picrique. La lecture se fait au bout de 15 minutes à 520 m μ . Pour chaque valeur de pH on fait parallèlement un essai à blanc où 5 ml d'eau sont traités de la même façon que la solution de créatinine.

- T A B L E A U N° V -

ELUTION, EN FONCTION DU pH, DE LA CREATININE FIXEE
SUR ARGILE

Densité optique abs. x 100 lue à 520 m μ après adsorption sur		
pH	R. LLOYD	Taourirt acidifiée
6,5	1,5	2
7,2	5,8	8,5
8,2	8,7	10,4
9,2	8,8	10,1
10	9	9
10,9	8,7	9,6
Témoin	9,4	

Résultats:

D'après les valeurs consignées dans le tableau V, il est facile de voir que la quantité de créatinine éluee augmente avec le pH. L'élution de la créatinine fixée est totale à partir de pH 8 pour la terre de Taourirt acidifiée, et à partir de pH 9 seulement, pour le réactif de LLOYD.

Rappelons, que le réactif picrique employé dans la technique d'OWEN et coll. (87), ayant un pH compris entre 10,8 et 11, assure une élution complète de la créatinine.

D.- ETUDE COMPARATIVE ENTRE LA METHODE CLASSIQUE DE FOLIN ET LES TECHNIQUES PAR ADSORPTION.

Nous ne comparons ici que les résultats obtenus et non les techniques elles-mêmes dont l'une a déjà été décrite p.60 . Pour les dosages de créatinine urinaire et sérique selon FOLIN, nous avons suivi le mode opératoire tel qu'il est indiqué par HAWK et coll. dans "Practical physiological Chemistry", p.506 et 839 (59), avec cette différence que nous avons remplacé la défécation tungstique I/10 de FOLIN et WU par celle de BROD et SIROTA (22) I/4.

Dans les techniques par adsorption, nous avons comparé les résultats trouvés à l'aide des argiles montmorillonitiques (Mt-H, terre de Taourirt et bentonite Prolabo traitées par l'acide chlorhydrique) à ceux que donne le réactif de LLOYD.

En ce qui concerne la validité de la loi de BEER-LAMBERT, la stabilité de la coloration et la reproductibilité des courbes d'étalonnage, nous renvoyons au chapitre III, p. 17 et aux graphiques n° I - 5.

En consultant le tableau VI, on remarque que les résultats obtenus sur 5 urines différentes concordent si bien qu'il est permis d'y voir une preuve supplémentaire du fait établi par MILLER et DUBOS (85), que dans l'urine, la créatinine représente tout près de 100 pour 100 du matériel chromogène total; cela autorise donc aussi à doser la créatinine urinaire en pratiquant la réaction de JAFFE directement sur l'urine diluée. (Voir aussi les valeurs trouvées sur l'urine, tableau IX, p.72.)

- T A B L E A U N° VI -
=====

DOSAGES COMPARATIFS DE LA CREATININE URINAIRE PAR
DIFFERENTES METHODES

Urine	Créatinine en g/l.			
	FOLIN	R. LLOYD	Taourirt acidifiée	Bentonite Prolabo acidifiée
1	1,80	1,84	1,82	1,88
2	1,93	1,90	1,95	1,90
3	1,27	1,25	1,22	1,20
4	0,88	0,85	0,90	0,85
5	1,80	1,75	1,80	1,80

Dosant la créatinine dans 6 sérums différents, nous avons trouvé qu'en moyenne les teneurs en créatinine déterminées à l'aide des adsorbants sont d'environ 10 pour 100 inférieures à celles que donne la méthode directe de FOLIN et WU (Tableau VII); ceci est en accord avec la notion classique que la créatinine ne forme que 80 à 100 pour 100 des chromogènes responsables de la réaction de JAFFE dans le sérum normal (voir aussi les valeurs données dans le tableau IX, p. 72).

Le tableau VIII démontre clairement que l'emploi d'un réactif de LLOYD "activé" par l'acide chlorhydrique n'est pas recommandable, les résultats étant toujours supérieurs à ceux trouvés par la méthode de FOLIN et WU; en effet, il s'agit ici de différences trop notables (plus de 10 pour 100), pour qu'on puisse les attribuer aux erreurs d'expérience. Une explication de ce phénomène a déjà été suggérée au chapitre III (v. p. 44).

Les concentrations en créatinine observées tombent dans les limites normales indiquées récemment par CAI'ARA et coll. (24) pour le sérum, c'est-à-dire chez les hommes: de 0,95 à 1,29 mg/100 ml, chez les femmes: de 0,77 à 0,98 mg/100 ml.

DOSAGES COMPARATIFS DE LA CRÉATININE, PRÉEXISTANTE DANS LE SÉRUM O J SURJOUTÉE
PAR DIFFÉRENTES MÉTHODES.

Sérum	FOLIN et WU			R. LLOYD			Mt-H			Taourit acidifiée			Bantone acidifiée		
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
1 (♀)	8.4	16.8	84	7	16.2	92.5	7.6	18	104	7	15.5	85	-	-	-
2 (♀)	7.8	17.7	99	6	14.5	85	7.2	17	97.5	6.2	16	98	6.5	16.3	98
3 (♀)	7.8	18	102	8	17.5	95	-	-	-	7	16.5	95	7.5	17.5	100
4 (♂)	9	19.2	102	9	19	100	-	-	-	8	17.7	97.5	7.8	18	102
5 (♂)	9	19.2	102	9	19	100	-	-	-	8	17.7	97.5	7.8	18	102
6 (♂)	8.4	18.6	102	7.5	17.8	103	-	-	-	7.8	17.5	97	7.5	17.5	100

(1) : Valeurs de la créatinine sérique en mg/litre
(2) : Valeurs de créatinine après addition d'une quantité de créatinine correspondant à 10 mg/litre.
(3) : Pourcentage de créatinine retrouvée.

- T A B L E A U N° VIII -

Créatinine en mg/l		
Sérum	FOLIN et WU	R. LLOYD acidifié
1	7,8	9,1
2	7,8	8,2
3	9	10,3
4	9	10,4

E.- EPREUVES DE CLEARANCE DE LA CREATININE ENDOGENE.-

Le but des quelques épreuves de clearance de la créatinine endogène que nous avons pratiquées, a été surtout l'application de la technique de dosage que nous avons choisie comme celle qui paraissait unir le mieux la simplicité à la précision. Le côté physiologique était secondaire pour nous. Aussi avons-nous choisi un mode opératoire aussi simplifié que possible en nous inspirant des indications de CAMARA, ARN, REIMER et NEWBURGH⁽⁴⁾, de SCHÖCH et CAMARA (100) ainsi que de HAMBURGER et RYCKEWAERT (52). Nous avons alors procédé de la façon suivante: le jour qui précède l'épreuve, la quantité de viande est réduite à 75 g servis au repas de midi. Le lendemain matin à 6 h, miction spontanée, dont le produit est jeté. Entre 6 h et midi, les urines sont soigneusement recueillies et vers 9h, on fait une prise de sang; un petit déjeuner exempt de viande est autorisé.

Pour le calcul, nous appliquons la formule classique:

$$C = \frac{U \times V}{P}$$

U = mg de créatinine/ml d'urine, V = nombre de ml d'urine/minute et P = mg de créatinine/ml de sérum ou plasma.

Résultats:

Selon la recommandation de HAMBURGER et RYCKEWAERT (52), nous n'avons pas tenu compte de la surface corporelle de l'individu. Chaque épreuve est répétée à quelques jours d'intervalle. C'est la moyenne des deux épreuves qui est utilisée en clinique.

Sur le tableau IX, on remarque une fois encore que les 4 techniques donnent des valeurs concordantes dans l'urine. Dans le sérum, sauf une exception, sans doute accidentelle, les techniques par adsorption donnent, comme prévu, des résultats inférieurs à ceux trouvés par la méthode de FOLIN et WU. Ce qui est surprenant, c'est la divergence des valeurs des clearances calculées dans 2 des 4 expériences. Cela provient de ce que la clearance résulte d'un quotient et donc que divergences ou erreurs expérimentales sont susceptibles de s'ajouter. Tout ceci prouve à quel point il faut être circonspect dans l'interprétation d'une valeur de clearance; en général, la clearance la plus petite s'obtient par la technique de

DETERMINATION DE LA CLEARANCE DE LA CREATININE ENDOGENE PAR DIFFERENTES METHODES.

Sujet n° 1 (C)

	1. <u>Expérience</u>			2. <u>Expérience</u>		
	U en g/l	P en mg/l	Clearance	U en g/l	P en mg/l	Clearance
M ^{de} FOLIN Réactif de LLOYD Terre de Taourirt acidifiée Bentonite Pro-labo acidifiée	1,35	10,8	116	1,02	10,7	109
	1,42	10,5	127	1,00	10,0	114
	1,35	11,5	109	1,05	10,5	114
	1,35	10,0	125	1,00	10,0	114
V = 0,93 ml/min				V = 1,14 ml/min.		

Sujet n° 2 (q)

	1. <u>Expérience</u>			2. <u>Expérience</u>		
	U en g/l	P en mg/l	Clearance	U en g/l	P en mg/l	Clearance
M ^{de} FOLIN Réactif de LLOYD Terre de Taourirt acidifiée Bentonite Pro-labo acidifiée	1,45	9,7	105	1,85	8,0	116
	1,40	7,7	127	1,80	7,7	117
	1,35	8,0	118	1,80	7,5	120
	1,45	7,8	130	1,80	7,7	117
V = 0,70 ml/min.				V = 0,50 ml/min.		

FOLIN et WU qui donne pour P la valeur la plus forte.

Le volume du filtrat glomérulaire, chez l'homme normal, est voisin de 130 ml/minute pour une surface corporelle de 1,73 m². Les recherches de PAGET (88) situent ses variations entre 110 et 160 ml.

La clearance de la créatinine endogène permet donc de se faire une idée assez exacte du taux de filtration glomérulaire. Les choses se compliquent chez les individus malades du rein où le taux de filtration glomérulaire est plus ou moins abaissé. Alors que le rapport des clearances de la créatinine endogène et de l'inuline est voisin de l'unité si les reins sont normaux, ce même rapport s'écarte plus ou moins fortement de l'unité quand le tissu rénal est lésé. Il a été établi que dans ce dernier cas, la clearance de la créatinine endogène dépasse la clearance de l'inuline dans une mesure qui dépend de l'importance de la lésion rénale. D'après DOERING et coll. (29, 30) ainsi que SCHWAB (101), il faudrait envisager dans ce cas une sécrétion supplémentaire de créatinine par le tubule rénal. Ces auteurs arrivent à la conclusion suivante qui nous semble raisonnable: la clearance de la créatinine endogène, si elle est déterminée sur une période suffisamment longue (24 heures, par exemple), pour se mettre à l'abri des erreurs résultant d'une récolte incomplète des urines, et si on prend le soin de doser la créatinine par une des méthodes réputées spécifiques, peut servir comme méthode de routine clinique. Quand le rein est malade, cette méthode peut encore donner des indications précieuses, surtout lorsque la filtration glomérulaire baisse considérablement. Les cas cliniques d'interprétation plus délicate, par suite de variations moins nettes, relèvent d'une méthode plus rigoureuse bien que beaucoup moins facile à mettre en oeuvre, la clearance de l'inuline, que l'on considère actuellement comme le procédé de référence.

F. - ADSORPTION ET CHROMOGENES NON-CREATININIQUES - VALEUR DES ADSORBANTS MONTMORILLONITIQUES.

Parmi les corps qui perturbent la réaction de JAFFE, les plus importants à considérer sont le glucose, l'acétone et l'acide pyruvique. Nous y avons ajouté l'acide ascorbique et l'acide lévulinique que nous avons étudiés surtout en rapport avec les dosages dans l'urine. Enfin, nous avons examiné l'influence de l'albumine urinaire et de l'azotémie sur le dosage de la créatinine.

Dans ce qui va suivre, nous allons étudier les dif-

(indiqué plus haut)
férents chromogènes dans l'ordre/ chacun d'entre eux
fait l'objet d'expériences en solution pure suivies
d'applications cliniques (sang, urines pathologiques).

a) CAS DU GLUCOSE.

Nous ajoutons de 5 à 100 mg de glucose en solution aqueuse à 15 μ g de créatinine, le tout étant porté à un volume de 5 ml. Les dosages sont effectués suivant la technique décrite au début de ce chapitre.

- T A B L E A U N° X -

PERTURBATION APPORTÉE PAR DES QUANTITÉS CROISSANTES DE
GLUCOSE AU DOSAGE DE 15 μ g DE CRÉATININE PAR
DIFFÉRENTES MÉTHODES.

Les valeurs relevées sont les densités optiques abs. x 100
lues à 520 m μ .

mg de glucose ajoutés à 15 μ g de créatinine	0	5	10	20	50	100
Terre de Taourirt acidifiée	10,8	10,8	11	10,9	11,6	11,9
Bentonite Prolabo acidifiée	10,7	10,8	10,7	10,8	11	11,8
M ^{de} FOLIN et WU	6	6	6,4	6,3	9,6	ins- table

Les résultats rassemblés dans le tableau X montrent que jusqu'à 1g/100 ml (prise d'essai = 5 ml), le glucose n'apporte pas de perturbation appréciable dans le dosage de la créatinine, que l'adsorption ait été faite sur terre de Taourirt ou sur bentonite Prolabo acidifiées. Avec une solution de glucose à 2 pour 100, l'erreur par excès est de 13,3 pour 100. Dans la technique de FOLIN et WU, le glucose commence à gêner à partir de 100 mg/100 ml (prise d'essai = 10 ml) où l'erreur est encore légère, mais elle augmente rapidement pour atteindre plus de 160 pour 100 avec 1 g/100 ml.

Remarque: dans ce dernier cas, la densité optique augmente au cours de la lecture, la réaction étant encore en pleine évolution. Finalement, tout le tube est envahi par une coloration rouge brunâtre due à la formation d'acide picramique.

Nous inspirant des expériences de HAUGEN (55), avec le réactif de LLOYD, nous avons additionné un sérum de glucose à raison de 10 g par litre.

Le tableau XI indique que dans ces conditions, le glucose fausse d'environ 20 pour 100 le dosage de la créatinine par la méthode de FOLIN et WU, alors qu'il est sans action après adsorption sur terre de Taourirt et bentonite Prolabo acidifiées.

- T A B L E A U N° XI -

PERTURBATION APPOREE PAR LE GLUCOSE AU DOSAGE DE LA
CREATININE SERIQUE PAR DIFFERENTES METHODES

Sérum	Densité optique abs. x 100 lue à 520 m μ	
	S	S'
Terre de Taourirt acidifiée	5,5	5,5
Bentonite Prolabo acidifiée	5,2	5,1
M ^{de} FOLIN et WU	2,8	3,7

(S) représente un sérum normal, (S') le même sérum additionné de 10 g de glucose par litre.

b) CAS DE L'ACETONE:

15 μ g de créatinine sont additionnés de 0,015 à 15 mg d'acétone en solution aqueuse et les dosages effectués comme pour le glucose.

Les résultats du tableau XII indiquent que l'acétone est beaucoup moins gênante dans les dosages par adsorption qu'elle ne l'est lorsqu'on emploie la méthode de FOLIN et WU, et une quantité de 60 mg/100 ml (prise d'essai = 5 ml) ne gêne pas avec les argiles montmorillonitiques, qui ramènent l'erreur maximum à 20 pour 100, alors que celle-ci dépasse 500 pour 100 dans le dosage pratiqué directement sur la solution.

- TABLEAU N° XII -

PERTURBATION APPORTÉE PAR DES QUANTITÉS CROISSANTES
D'ACÉTONE AU DOSAGE DE 15 μ g DE CREATININE PAR
DIFFÉRENTES MÉTHODES

Les valeurs relevées sont les densités optiques abs. x 100
lues à 520 m μ

mg d'acétone ajoutés à 15 μ g de créatinine	0	1,5	3	7,5	15
Terre de Taourirt acidifiée	11,1	11,5	11,5	12	12,6
Bentonite Prolabo acidifiée	10,4	10,6	10,8	11,2	12
M ^{de} FOLIN et WU	5,8	8,3	10,9	17	26,7

L'addition de 1 g pour 1000 d'acétone au sérum sanguin occasionne une erreur de 30 pour 100 environ dans la méthode de FOLIN et WU, alors qu'elle ne perturbe pas les dosages par adsorption (tableau XIII).

- TABLEAU N° XIII -

PERTURBATION APPORTÉE PAR L'ACÉTONE AU DOSAGE DE LA
CREATININE SÉRIQUE PAR DIFFÉRENTES MÉTHODES

(S) représente un sérum normal, (S') le même sérum additionné de 1 g d'acétone par litre.

	Densité optique abs. x 100 lue à 520 m μ .	
Sérum	S	S'
Terre de Taourirt acidifiée	5,8	5,9
Bentonite Prolabo acidifiée	5,4	5,4
M ^{de} FOLIN et WU	2,8	4

Application: Sang et urine de diabétique:

Afin de vérifier les résultats trouvés précédemment, nous avons dosé par différentes méthodes la créatinine dans le sang et dans l'urine de diabétiques avancés.

α). Sang: Au sujet du sang, il convient de faire une remarque importante. Pour les dosages de glycémie, il est souvent fait appel au fluorure de sodium comme anti-glycolytique. Or, nous nous sommes aperçu que le fluorure exerce une action fâcheuse: il gélifie la montmorillonite, de sorte qu'une centrifugation correcte devient impossible. Des essais faits avec une solution aqueuse de fluorure de sodium à 1 pour 100 (pH environ 7) et une solution de même concentration dans l'acide sulfurique 0,1 N (pH = 1), nous ont montré que la gélification des culots de centrifugation n'a lieu qu'en milieu acide. Ce phénomène ne se produit pas en présence d'oxalate de K. Nous avons donc préféré doser la créatinine sur un sang de diabétique sans addition d'anticoagulant ni d'antiglycolytique et cela peu d'heures après la prise de sang.

La glycémie est de 2,47 g par litre; l'urée sanguine est à 1,38 g par litre.

La technique de FOLIN et WU donne une teneur en créatinine de 0,024 g par litre.

Après adsorption sur terre de Taourirt acidifiée, on trouve 0,013 g de créatinine par litre.

La différence entre les deux méthodes étant presque du simple au double, il eût été intéressant de répéter le dosage sur un autre échantillon prélevé sur le même individu. Malheureusement, des circonstances indépendantes de notre volonté ne nous ont pas permis de le faire. L'interprétation de ce résultat doit donc rester prudente, surtout si on considère que tout n'est pas à mettre sur le compte du diabète, comme semble l'indiquer l'urémie relativement importante.

Une autre expérience conduite de la même façon sur un sang de diabétique, recueilli sur oxalate et dont la glycémie n'a été que de 1,7 g par litre, nous a donné les chiffres suivants pour la créatine:

méthode de FOLIN et WU : 0,0075 g par litre
adsorption sur terre de Taourirt acidifiée:
0,0085 g par litre,
adsorption sur bentonite Prolabo acidifiée:
0,0085 g par litre.

On peut penser d'après ceci que les chromogènes gênants tels que les corps cétoniques ne manifestent leur influence que dans le diabète avancé, et dans ces cas-là, il semble prudent de recourir à l'adsorption sur argile pour doser la créatinine vraie.

β). Urine: Il s'agit de l'urine de 24 heures récoltée chez un diabétique précomateux. Les caractéristiques de cette urine sont les suivantes:

sucres réducteurs	: 19,3 g par litre;
acétone	: 0,55 g par litre;
albumine	: 2,4 g par litre.

Profitant de la présence de l'albumine, nous avons omis à dessein la défécation qui est généralement recommandée avant le dosage proprement dit. De cette façon, nous avons pu étudier simultanément l'influence de l'albumine urinaire (v.p. 88 du glucose et de l'acétone.

Les résultats obtenus à l'aide des différentes méthodes comme celle de FOLIN, l'adsorption sur bentonite Prolabo acidifiée et sur réactif de LLOYD sont respectivement:

0,72 ; 0,68 ; 0,67 g de créatinine par litre.

Ces chiffres sont à considérer comme identiques, aux erreurs d'expériences près; ils indiquent clairement qu'aux concentrations envisagées, le glucose, l'acétone et l'albumine, même réunis, n'affectent pas le dosage de la créatinine urinaire par la technique classique de FOLIN. Par conséquent, l'emploi des adsorbants ne s'impose pas dans ce cas.

c) CAS DE L'ACIDE PYRUVIQUE:

15 μ g de créatinine sont mis en présence de 0,04 à 0,4 mg d'acide pyruvique ajouté sous forme d'une solution aqueuse.

- T A B L E A U N° XIV -
=====

PERTURBATION APPORTÉE PAR DES QUANTITÉS CROISSANTES
D'ACIDE PYRUVIQUE AU DOSAGE DE 15 μ g DE CREATININE
PAR DIFFÉRENTES MÉTHODES

Les valeurs relevées sont les densités optiques
abs. x 100 lues à 520 m μ .

mg d'acide pyruvique ajoutés à 15 μ g de créatinine	0	0,04	0,08	0,40
Terre de Taourirt acidifiée	11,5	11,3	11,8	12,7
Bentonite Prolabo acidifiée	11,3	11,2	11,6	12,3
Mde FOLIN et WU	5,5	6,5	7	12,3

L'interprétation des résultats consignés dans le tableau XIV est de nouveau en faveur des adsorbants montmorillonitiques avec lesquels l'acide pyruvique ne manifeste une influence perturbatrice que pour des concentrations supérieures à 1,6 mg/100 ml (prise d'essai = 5 ml); pour une teneur 8 fois supérieure à la dose moyenne physiologique qui est d'environ 1,1 mg/100 ml de sérum, l'erreur ne se monte qu'à 10 pour 100, tandis qu'avec la technique de FOLIN et WU, la même quantité d'acide pyruvique apporte une erreur de 128 pour 100.

Sur un sérum chargé en acide pyruvique à raison de 0,04 g par litre, l'erreur de 18,5 pour 100, observée dans le dosage direct, est réduite à zéro par emploi de la terre de Taourirt et de la bentonite Prolabo acidifiées.

- T A B L E A U N° XV -
=====

PERTURBATION APPORTEE PAR L'ACIDE PYRUVIQUE AU DOSAGE
DE LA CREATININE SERIQUE PAR DIFFERENTES METHODES

(S) représente un sérum normal, (S') le même sérum
additionné de 0,04 g d'acide pyruvique par litre.

Sérum	Densité optique abs. x 100 lue à 520 mμ	
	S	S'
Terre de Taourirt acidifiée	5,5	5,5
Bentonite Prolabo acidifiée	5,2	5,3
M ^{de} FOLIN et WU	2,9	3,8

Application:
Créatinine et Hyperpyruvicémie.

Les expériences que nous venons de décrire, nous
avaient montré l'importance de l'acide pyruvique qui, de
tous les chromogènes que nous avons étudiés, s'est révé-
lé être le plus actif sur le picrate alcalin en dehors
de la créatinine. Voilà pourquoi nous avons voulu réa-
liser une expérience supplémentaire sur du sang d'indi-
vidu présentant une forte pyruvicémie, ce qui est le cas
dans l'avitaminose B₁, chez les alcooliques et les indi-
vidus soumis au choc cardiazolique. Un concours heureux
de circonstances nous a permis de faire quelques dosages
de créatinine sur un sang de la dernière catégorie.

Sur 2 plasmas, contenant l'un 22,2, l'autre 21 mg
d'acide pyruvique au litre (x), nous trouvons les concen-
trations suivantes en créatinine:

méthode de FOLIN et WU: 11,25 mg et 7,7 mg par litre;
adsorption sur terre de Taourirt acidifiée: 8,5 mg et
5,5 mg par litre;
adsorption sur bentonite Prolabo acidifiée: 8,2 mg et
5 mg par litre ;
adsorption sur réactif de LLOYD: 8,7 mg et 5,5 mg par
litre;

(x) Le dosage de l'acide pyruvique a été fait aimablement
pour nous par notre ami J.J.BRIGNON Chef de laboratoire au
Centre psychothérapique de Nancy. Nous le remercions, à
nouveau, de sa grande obligeance.

Il en résulte que l'influence de l'acide pyruvique, nette aux concentrations qui sont le double de la normale, impose l'emploi d'une méthode spécifique pour doser la créatinine; sous ce rapport, les argiles montmorillonitiques sont absolument équivalentes au réactif de LLOYD.

d) ACIDE ASCORBIQUE ET REACTION DE JAFFE.

Lors de l'étude de la spécificité de la réaction de JAFFE, nous avons signalé que l'action fortement réductrice de l'acide ascorbique se manifeste déjà à froid vis-à-vis du picrate alcalin, bien que cette action, d'un mécanisme différent, soit beaucoup plus faible que celle due à la créatinine. Nous avons alors pensé qu'il serait intéressant de voir dans quelle mesure une thérapeutique énergique par l'acide ascorbique est susceptible d'influer sur le dosage de la créatinine urinaire. TAUSSKY (109), à la suite d'expériences in vitro, avait dit que jusqu'à 3 g par litre, l'acide ascorbique n'était pas gênant dans l'urine; cela nous avait paru étonnant, c'est pourquoi nous avons dosé la créatinine dans notre propre urine après ingestion, durant quinze jours d'une dose totale de 13 g de ce produit. Cette urine contenait alors 0,12 g d'acide ascorbique par litre, le dosage ayant été effectué par la méthode classique au 2,6-dichlorophénol-indophénol.

Le dosage de la créatinine par différentes méthodes a donné les résultats suivants:

méthode de FOLIN : 2,15 g par litre

adsorption sur terre de Taourirt acidifiée : 2,15 g par litre;

adsorption sur bentonite Prolabo acidifiée: 2,2 g par litre;

adsorption sur réactif de LLOYD: 2,24 g par litre.

Bien que nous ayons constaté une légère adsorption de l'acide ascorbique sur l'argile, la bonne concordance de ces chiffres prouve que le traitement vitaminé ne perturbe pas le dosage de la créatinine urinaire. Cependant, TAUSSKY (109) a conseillé une oxydation de l'urine par l'iode à pH 6, avant d'y doser la créatinine par sa micro-méthode, ceci afin d'éliminer l'influence perturbatrice de l'acétone, de l'ester acétylacétique et de l'acide ascorbique éventuellement présents. Nous nous sommes d'ailleurs étonné de ce que l'oxydation par l'iode puisse faire disparaître le pouvoir chromogène de l'acide ascorbique, cette oxydation devant faire apparaître des fonc-

tions cétoniques susceptibles d'être chromogènes, comme l'illustre l'équation ci-après:



Nous étudierons ce dernier point après avoir vérifié qu'aux concentrations élevées l'acide ascorbique ne fausse pas la réaction de JAFFE.

A cet effet, nous avons additionné une urine normale de 3 g d'acide ascorbique par litre et nous avons traité le mélange selon TAUSKY: à 5 ml de cette urine amenée à pH 6 sont ajoutée une quantité suffisante de solution d'iode 0,05 n pour colorer l'empois d'amidon (soit 3,55 ml) et de l'eau distillée pour avoir 10 ml dont 1 ml correspond à 0,5 ml d'urine primitive. Dans un autre essai, nous répétons l'oxydation par l'iode sur la même urine amenée à pH 3,2, cette valeur étant celle recommandée par le Codex pour le dosage de l'acide ascorbique par iodométrie; la quantité d'iode nécessaire pour amener le virage de l'empois d'amidon est de 3,5 ml, donc pratiquement la même qu'à pH 6. Nous dosons en outre la créatinine sur deux témoins: l'urine telle quelle, et l'urine additionnée de 3 g d'acide ascorbique par litre.

Résultats:

La technique de FOLIN pour l'urine ne donne aucune différence entre les quatre types d'urine quant à leur teneur en créatinine qui est de:

1,75 g par litre (urine telle quelle), 1,76 g par litre (urine avec 3 g d'acide ascorbique par litre), 1,8 g par litre (urine traitée selon TAUSKY) et 1,8 g par litre (urine oxydée à pH 3,2).

Donc, même à 3 g par litre, l'acide ascorbique ne gêne pas le dosage de la créatinine urinaire.

Les essais que nous avons alors pratiqués montrent que la présence de 3 mg d'acide ascorbique dans la prise d'essai (ce qui correspond bien à 3 g par litre) commence seulement à fausser le dosage de la créatinine urinaire

par la méthode de FOLIN. Or, dans notre expérience précédente, bien qu'il s'agisse d'une urine à 3 g d'acide ascorbique par litre, nous n'avions que 0,75 mg d'acide ascorbique dans la prise d'essai qui était de 0,25 ml d'urine; ceci explique le résultat négatif trouvé.

En possession de ces données, nous avons alors dosé la créatinine par la méthode de FOLIN:

- a) sur 0,5 ml d'urine dépourvue d'acide ascorbique (U);
- b) sur 0,5 ml de la même urine renfermant 3 mg d'acide ascorbique (U_c);
- c) sur 0,5 ml d'urine avec 3 mg d'acide ascorbique ayant subi l'oxydation par la solution d'iode 0,05 n à pH 6 (U_T).

Les résultats ci-dessous montrent l'inutilité de l'oxydation par l'iode dans ces conditions:

	U	U_c	U_T
D. opt. absolue x 100 $-\lambda = 520 \text{ m}\mu$	37,3	38,5	38,6

Action de l'acide déhydroascorbique sur la réaction de JAFFE:

Nous avons préparé l'acide déhydroascorbique à partir d'une solution d'acide ascorbique à 1 g pour 1000 dans de l'eau distillée bouillie. 10 ml de cette solution dont le pH est environ 3,1, sont titrés par l'iode 0,1 n en présence d'empois d'amidon, ce qui réalise la transformation quantitative en acide déhydroascorbique. Dans notre expérience, il faut 1,15 ml d'iode 0,1 n; avec de l'eau distillée bouillie nous complétons alors à 20 ml.

Pour pouvoir mettre en évidence la réactivité différente de l'acide ascorbique et de son produit d'oxydation, il a fallu faire appel à une technique plus sensible que ne l'est celle de FOLIN pour l'urine. Après quelques tâtonnements, nous avons adopté le mode opératoire de FOLIN et WU pour le sang, le volume total du liquide coloré n'étant que de 15 ml au lieu de 100 ml dans la première technique. Ainsi, pour faire la réaction de JAFFE, nous ajoutons à des quantités croissantes de solution d'acide

ascorbique ou d'acide déhydroascorbique de même concentration, complétées à 10 ml avec de l'eau, successivement 4,3 ml de solution saturée d'acide picrique et 1,7 ml de soude à 10 pour 100. Comme il était intéressant de savoir si la cinétique de la réaction était différente dans les deux cas, nous avons fait des lectures de 5 minutes en 5 minutes pendant les 30 minutes qui suivent l'addition des réactifs.

- T A B L E A U N° XVI -

CINETIQUE DE LA REACTION DE L'ACIDE ASCORBIQUE ET DE L'ACIDE DEHYDROASCORBIQUE AVEC LE PICRATE ALCALIN.

1° Expérience:

	Essai à blanc	ACIDE ASCORBIQUE			AC. DEHYDROASCORBIQUE		
		1 mg	2 mg	5 mg	1 mg	2 mg	5 mg
5 min.	17.9	20	24.5	41.8	21.5	29.8	69
10 min.	17.9	20.4	27.3	53	21.4	29.6	68
15 min.	17.9	21	29.6	61	21.2	29	67.5
20 min.	18	21	31	66.5	21.1	28.8	67

2° Expérience:

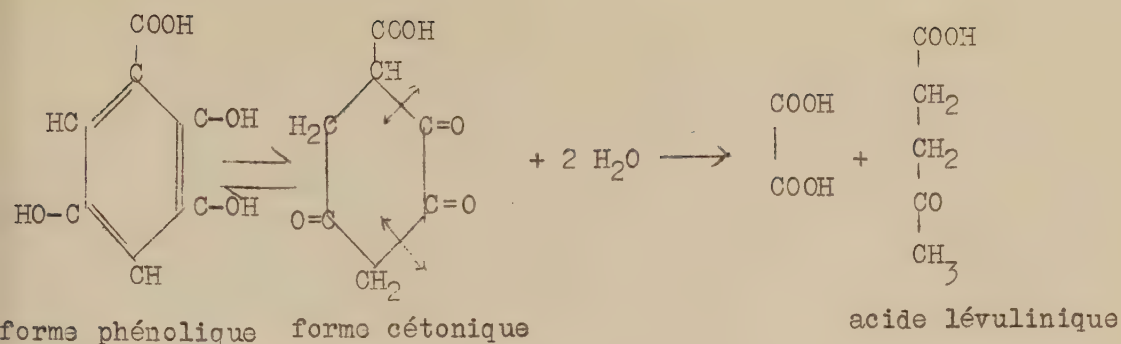
	Essai à blanc	ACIDE ASCORBIQUE		AC. DEHYDROASCORBIQUE	
		2 mg	4 mg	2 mg	4 mg
5 min.	17.2	23.2	34.5	29.9	55.8
10 min.	17.3	25.9	43	29.2	55
15 min.	17.1	27	48	28.9	54.7
20 min.	17.1	28	51.9	28.7	53.9
30 min.	17	29.5	57.1	28.4	53

Les fortes densités optiques du début montrent que la réaction avec l'acide déhydroascorbique démarre plus vite qu'avec l'acide ascorbique; mais, tandis que la coloration due à ce dernier fonce progressivement, le contraire se produit avec le composé déshydrogéné. Ce phénomène semble indiquer une sorte de destruction ou simplement une inactivation de l'acide déhydroascorbique dont la grande instabilité est d'ailleurs connue. On pourrait en voir la cause dans la forte alcalinité du milieu. Quoi qu'il en soit, les chiffres réunis dans les deux tableaux ne parlent pas contre notre raisonnement de départ, à savoir l'exaltation du pouvoir JAFFE-positif chez le composé renfermant deux fonctions CO.

e. L'ACIDE LEVULINIQUE EN TANT QUE CHROMOGENE. INFLUENCE DE LA MEDICATION SALICYLEE SUR LE DOSAGE DE LA CREATININE TOTALE.

C'est FOLIN qui a signalé en 1914 (35) que l'acide lévulinique ou acétylpropionique ($\text{CH}_3\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$) est JAFFE-positif. Cette observation avait alors surtout un intérêt théorique, l'acide lévulinique n'étant pas de ceux qu'on rencontre couramment dans les milieux biologiques. Mais depuis lors, l'arsenal thérapeutique s'est enrichi d'un composé calcique particulièrement assimilable, le lévulinate de calcium. Il est donc fort possible qu'au cours d'un traitement énergique par ce produit, on se trouve en présence de quantités relativement importantes d'acide lévulinique. Il est possible aussi que le traitement par les salicylates intervienne dans le dosage de la créatinine, puisque les travaux de DUMAZERT et EL OUACHI (32) ont récemment mis en lumière la formation d'acide lévulinique à partir d'un métabolite des salicylates dans l'urine.

D'après ces auteurs, le métabolisme des salicylates comprend une suite d'oxydations qui transforment l'acide salicylique successivement en acide gentisique et en acide trihydroxybenzoïque. Ce dernier, qui n'est pas connu à l'état libre, doit exister dans l'urine humaine sous forme de combinaison avec le glyco-colle et l'acide glycuronique. Les auteurs cités ont pu mettre en évidence dans les hydrolysats obtenus par traitement acide ménagé de l'urine d'individus soumis au traitement salicylé, la présence d'acide lévulinique, alors que cet acide est absent d'hydrolysats d'urines normales. L'acide lévulinique est le produit caractéristique de la décomposition spontanée de l'acide trihydroxy-2,3,5-benzoïque lors de l'hydrolyse ménagée de l'urine suivant l'équation (32):



Les auteurs concluent qu'en définitive la fraction de l'acide salicylique qui arrive au stade acide trihydroxybenzoïque, précurseur immédiat de la rupture du cycle benzénique, est de moins de 15 pour 100, donc assez faible. L'acide lévulinique a justement été mis en évidence par la réaction de JAFFE.

A la suite de ces considérations, il nous a paru intéressant de vérifier si la médication salicylée pouvait gêner le dosage de la créatinine et, dans l'affirmative, voir par quel moyen cette cause d'erreur pouvait être neutralisée.

Tout d'abord, nous avons voulu nous assurer que dans l'urine d'une personne traitée aux salicylates, le dosage de la créatinine préformée, dosage qui ne nécessite pas de traitement acide préalable, n'est pas gêné. A cet effet, nous avons dosé la créatinine dans une urine d'adolescent ayant reçu par voie veineuse 2 g de salicylate et par voie buccale 4 g d'acétylsalicylate de calcium, cela au cours d'un traitement réparti sur 10 jours.

Les teneurs en créatinine trouvées sont:

par la méthode de FOLIN : 0,77 g par litre;
 après adsorption sur terre de Taourirt acidifiée:
 0,72 g par litre;
 après adsorption sur bentonite Prolabo acidifiée:
 0,72 g par litre;
 après adsorption sur réactif de LLOYD: 0,75 g par litre.

La concordance de ces valeurs permet de conclure que l'administration de salicylates ne fausse pas le dosage de la créatinine préformée par la réaction de JAFFE.

Pour l'étude proprement dite de l'acide lévulinique,

il fallait faire l'hydrolyse acide de l'urine d'un sujet ayant absorbé du salicylate; si une telle urine avait contenu de la créatine, celle-ci aurait formé de la créatinine lors du traitement hydrolytique, ce qui aurait faussé le résultat. Une urine de sujet adulte de sexe masculin ne contenant pas de créatine et soumis à un traitement salicylé aurait dû être choisie. Faute d'en pouvoir trouver, nous avons absorbé nous-même 5,5 g de gentisate de sodium (Gentisod) en 12 heures et dosé la créatinine dans l'urine récoltée le jour suivant.

Les résultats suivants ont été obtenus:

a). dosage de la créatinine avant traitement acide:

méthode de FOLIN: 2,07 g par litre;
adsorption sur terre de Taourirt acidifiée: 2,05 g
par litre;
adsorption sur réactif de LLOYD: 2,05 g par litre.

b). dosage de la créatinine après hydrolyse par l'acide chlorhydrique:

α). Passage à l'autoclave (comme pour le dosage de la créatinine totale).

5 ml d'urine mélangés avec 5 ml d'eau distillée et 10 ml d'acide chlorhydrique normal sont chauffés en tube bouché au coton cardé pendant 30 minutes à 120°. Après refroidissement, le liquide brunâtre est neutralisé par 10 ml de soude normale et le dosage de la créatinine terminé comme dans l'expérience précédente. Nous notons les résultats suivants:

méthode de FOLIN: 2,05 g par litre;
adsorption sur terre de Taourirt acidifiée: 2,15 g
par litre;
adsorption sur réactif de LLOYD: 2,10 g par litre.

β). Passage au bain-marie bouillant en présence de quantités variables d'acide chlorhydrique.

Ière expérience: 20 ml d'urine + 0,2 ml d'acide chlorhydrique de densité 1,16 sont mélangés dans un petit erlenmeyer qui est bouché au coton cardé et plongé pendant 5 minutes exactement dans un bain-marie à ébullition franche; on refroidit rapidement par immersion dans de la glace fondante. Pour neutraliser l'excès d'acide,

nous ajoutons à 5,05 ml d'hydrolysate 0,5 ml de soude normale et de l'eau pour avoir au total 10 ml de liquide, dont 1 ml correspond à 0,5 ml d'urine primitive.

Pour doser la créatinine, nous nous sommes contenté de la méthode de FOLIN qui nous a donné une concentration de 1,98 g par litre.

2ème expérience: le mélange de 20 ml d'urine et de 1 ml d'acide chlorhydrique (donc une quantité quintuple de celle utilisée dans la première expérience) est traité dans les mêmes conditions. Pour neutraliser, nous ajoutons à 5,25 ml d'hydrolysate 2,5 ml de soude normale et nous complétons à 10 ml avec de l'eau distillée; 1 ml de ce liquide correspond à 0,5 ml d'urine primitive.

Le dosage de la créatinine par la technique de FOLIN donne une teneur de 2 g par litre.

8) Hydrolyse à froid:

Les conditions employées pour l'hydrolyse à chaud pouvaient paraître trop brutales pour permettre la mise en évidence de l'acide lévulinique éventuellement présent. C'est pourquoi nous avons tenté l'hydrolyse à froid en laissant en contact à la température de 24° pendant 24 heures deux échantillons de la même urine additionnée de 1 et de 5 pour 100 d'acide chlorhydrique de densité 1,16. Après avoir neutralisé à la soude normale comme il est indiqué plus haut, nous avons dosé la créatinine par la technique de FOLIN qui nous a permis d'en trouver dans les deux cas 2 g par litre.

En outre, nous n'avons pas pu trouver de modification notable de la cinétique de la réaction colorée avec les échantillons hydrolysés au bain-marie et à froid.

En résumé, dans nos conditions expérimentales, les produits d'élimination du gentisate de sodium dans l'urine ne contenaient pas d'acide lévulinique ni de produits susceptibles de perturber la réaction de JAFFE, même après hydrolyse chlorhydrique à l'autoclave.

f. INFLUENCE DE L'ALBUMINE URINAIRE.

Comme nous l'avons signalé au sujet de l'urine de diabétique, la présence d'albumine dans le dosage de la créatinine urinaire ne semble pas influencer le dévelop-

pement de la coloration de JAFFE. Afin de vérifier ceci, nous avons dosé la créatinine par diverses techniques dans des urines de néphritiques ou de néphrotiques ayant des teneurs variables en albumine, avant et après défécation à l'acide trichloracétique à 30 pour 100 ajouté à raison de 1 volume à 10 volumes d'urine; après avoir bien mélangé avec un agitateur et laissé en repos pendant 1/4 d'heure, le liquide est centrifugé. Les dosages se font sur une portion aliquote de liquide surnageant après neutralisation approximative avec de la soude normale en présence de papier indicateur MERCK.

Les résultats ont été réunis en tableau synoptique, ce qui permet de dégager facilement la conclusion qu'aux concentrations envisagées, la présence d'albumine dans une urine peut être négligée pour doser la créatinine.

Cependant, nous croyons prudent d'ajouter que lors du dosage de la créatinine totale, le chauffage en présence d'acide chlorhydrique est susceptible d'hydrolyser l'albumine urinaire avec formation de composés pouvant gêner la réaction de JAFFE.

Remarque: Comme on peut s'y attendre, l'addition de la solution d'acide picrique provoque un trouble floconneux dont l'importance est fonction de la quantité d'albumine présente. L'addition de soude solubilise les protéines et rend le milieu propre à une lecture colorimétrique.

g - CREATININE ET AZOTEMIE.

Afin de compléter nos recherches sur les chromogènes non créatininiques, nous avons voulu doser la créatinine dans des néphropathies ou dans d'autres affections donnant lieu à une azotémie prononcée qui, elle, accompagnerait, au dire des auteurs, l'augmentation du taux de chromogènes non-créatininiques. Nous aurions aimé avoir des sérums riches en corps JAFFE-positifs non créatininiques et montrer que dans ce cas la montmorillonite était aussi efficace ou meilleure que le réactif de LLOYD et à fortiori que la technique de FOLIN. Malheureusement, nous n'avons pu nous procurer (x) que le sérum de 3 malades seulement, chez lesquels nous pouvions espérer une augmentation des chromogènes non-créatininiques; encore 2 d'entre eux atteints, l'un de néphrite

(x) Nous remercions Mlle DAUCHY, Interne en pharmacie et le Docteur HENSEN du service de M. le Professeur HERBEUVAL, de la complaisance qu'ils ont apportée à essayer de nous procurer des sérums et des urines pathologiques intéressants pour nous.

- T A B L E A U N° XVII -
=====

DOSAGE DE CREATININE DANS DES URINES ALBUMINEUSES, AVEC OU SANS DEFECATION.

L'urine 1 provient d'une néphrite, les urines 2 et 3 de néphroses lipoidiques.

Creatinine en g/l									
Urine	Albumine en g/l	FOLIN		L. ILLOYD		Taourirt acidifié		Bentonite Prolebo acidifiée	
		Avant défec.	Après défec.	Avant défec.	Après défec.	Avant défec.	Après défec.	Avant défec.	Après défec.
1	0,85	1,12	1,15	1,12	1,25	1,15	1,20	1,12	1,12
2	4	1,45	1,48	1,55	1,55	1,60	1,63	-	-
3	15	2,20	2,20	2,20	2,28	2,24	2,30	-	-

subaiguë, l'autre de néphrose lipoïdique, avaient-ils une urée sanguine normale et un taux de chromogènes non-créatininiques indosable. Seul un cas de sténose pylorique s'accompagnait d'hyperazotémie; les chromogènes non adsorbables sur argile formaient environ 10 pour 100 de la créatinine et les valeurs trouvées avec Mt-H, la terre de Taourirt acidifiée et le réactif de LLOYD ont été identiques aux erreurs d'expérience près (tableau XVIII).

- T A B L E A U N° XVIII -

DOSAGES COMPARATIFS DE CREATININE DANS QUELQUES SERUMS
PATHOLOGIQUES.

Diagnostic	Urée en g/l	Créatinine en mg/l.			
		FOLIN et WU	R. LLOYD	Mt-H	Taourirt acidifiée
Sténose pylorique	2,40	20,5	18,5	18,5	18,8
Néphrite subaiguë	0,40	9,7	9	8,5	9
Néphrose lipoïdique	0,35	12,6	12,5	13	13

CONCLUSIONS GENERALES -

=====

Dans ce travail, nous avons commencé par montrer l'intérêt qui s'attache encore au dosage correct de la créatinine dans l'urine et dans le sang, et nous avons plus particulièrement attiré l'attention sur la valeur - très discutée à l'heure actuelle - de la clearance de la créatinine endogène.

Les nombreux travaux qui ont paru et qui paraissent encore sur ce sujet, sont très souvent contradictoires; cela nous paraît résulter surtout de ce que beaucoup de facteurs ont une importance considérable dans un dosage dont la grande simplicité n'est qu'apparente.

Le premier chapitre est consacré au rappel de certaines propriétés de la créatinine, en particulier à l'équilibre créatine-créatinine in vitro et in vivo, où il semble régir la créatininurie.

Nous examinons dans le deuxième chapitre comment se pose le problème du dosage de la créatinine dans l'urine et dans le sang; dans l'urine, après dilution convenable, le dosage ne diffère guère du dosage en solution pure, tandis qu'il est nécessaire de faire subir au sang une défécation appropriée qui influe d'ailleurs fortement sur la valeur du dosage ultérieur.

Le troisième chapitre a trait à la réaction de JAFFE, base de la plupart des techniques de dosage de la créatinine. Nous en faisons une étude critique qui est fondée sur de nombreuses expériences personnelles rapportées dans le texte.

I°. Nous étudions d'abord les techniques classiques de FOLIN en insistant plus spécialement sur les points suivants:

a). le domaine de validité, assez restreint, de la loi de BEER-LAMBERT; les prises d'essai sur lesquelles sera pratiquée la réaction de JAFFE sont variables d'une méthode à l'autre et doivent ne contenir que de faibles quantités de créatinine, les concentrations optimales recommandées par les auteurs s'échelonnant entre 0 et 5 mg/100 ml de solution à analyser; valeurs qui sont

fonction des conditions opératoires (longueur d'onde, concentration du milieu réactionnel);

b). l'influence, trop souvent méconnue, du pH du déféc
cat sanguin; l'intensité de la coloration dépend avant
tout de la concentration en alcali, concentration qui
doit être proportionnée à l'acidité du déféc
cat. Les méthodes par adsorption-élution permettent d'opérer dans
des conditions mieux standardisées, grâce au pouvoir
tampon exercé par l'adsorbant;

c). les substances d'intérêt biologique qui sont capa-
bles d'interférer avec la créatinine dans le dosage colo-
rimétrique par la réaction de JAFFE. Ces substances sont
nombreuses et parmi celles qui ont été étudiées, le glu-
cose, l'acétone, l'acide acétylacétique et l'acide pyru-
vique ont une influence certaine; cependant, il faut ad-
mettre l'existence d'autres "chromogènes non-créatinini-
ques" qui attendent encore d'être identifiés.

Nous avons établi que l'acide ascorbique et les
stéroïdes à groupement cétonique libre tels que la fol-
liculine, la testostérone et la transdéhdroandrosterone
sont trop faiblement JAFFE-positifs pour pouvoir gêner
le dosage de la créatinine;

d). l'élimination des chromogènes; le procédé par ad-
sorption-élution paraît être le moyen à la fois le plus
efficace et le plus simple de la réaliser. Les procédés
chimiques par défécation et par oxydation sont ou insuf-
fisants ou trop énergiques.

2°. L'emploi de microorganismes adaptés à l'utilisa-
tion exclusive de la créatinine comme source d'azote,
a permis à MILLER et DUBOS de faire un dosage indirect
dans l'urine et dans le plasma, dosage très intéressant
du point de vue théorique, mais difficile à appliquer
en clinique.

3°. Le dosage de la créatinine après adsorption sur du
réactif de LLOYD (silicate d'aluminium hydraté) suivie
d'élution, est examiné de façon critique pour déterminer
les conditions dans lesquelles toute la créatinine est
fixée et où le maximum de chromogènes gênants est élimi-
né. Dans des conditions expérimentales déterminées, le
procédé est fidèle et très satisfaisant.

Dans le quatrième chapitre, nous résumons les métho-
des de dosage basées sur une réaction autre que celle de
JAFFE.

1° La méthode au dinitrobenzoate est d'application délicate.

2° Les méthodes au complexe mercurique, également laborieuses, ne présentent pas d'avantages sur celles qui font appel à la réaction classique de JAFFE.

3° Nous avons consacré une longue étude expérimentale à la réduction du ferricyanure alcalin par la créatinine et nous en rapportons les principaux résultats; cette réduction est très régulière en solution pure. Dans les conditions que nous avons précisées, 1 molécule de créatinine réduit 2,5 molécules de ferricyanure. Mais nous n'avons pu nous débarrasser commodément de toutes les autres substances qui sont oxydables par le ferricyanure en milieu alcalin et qui se comportent comme la créatinine vis-à-vis des adsorbants argileux; sous ce rapport l'adsorption, l'élution et l'oxydation de l'acide urique ont été particulièrement étudiées. Enfin, nous précisons le rôle du noyau imidazole dans l'oxydation par le ferricyanure.

Le cinquième et dernier chapitre est réservé entièrement à des recherches personnelles. Au réactif de LLOYD, mal défini, difficile à se procurer en France et dont l'activité varie avec la provenance, nous proposons de substituer la montmorillonite convenablement préparée. Ainsi la terre de Taourirt et les "bentonites" commerciales, traitées par les acides, donnent facilement une montmorillonite acide (Mt-H), seule active pour adsorber quantitativement la créatinine. En substituant Mt-H au réactif de LLOYD, la technique d'OWEN et coll. permet le dosage correct et commode de la créatinine urinaire et sérique. Pour des valeurs comprises entre 0 et 7, le pH du défécât n'intervient pas dans la fixation de la créatinine en raison de l'acidité propre de Mt-H, et l'élution est totale dès pH 8. En ce qui concerne l'élimination des "chromogènes non-créatininiques", Mt-H est au moins équivalente au réactif de LLOYD ainsi qu'il résulte d'expériences que nous avons faites:

1° sur une solution pure de créatinine et sur du sérum enrichi en glucose, acétone, acide pyruvique;

2° sur des sangs et des urines de malades atteints de diabète, d'hyperpyruvicémie consécutive à un choc cardiologique, de néphrite, de néphrose lipopidique et d'hyperazotémie.

Dans le même ordre d'idées, nous avons vérifié que l'influence de l'acide ascorbique dans le dosage de la

créatinine urinaire est négligeable; l'acide déhydroascorbique, obtenu par oxydation à partir de l'acide ascorbique, s'est révélé être plus fortement JAFFE-positif, mais sa stabilité est aussi moindre.

Pensant à l'acide lévulinique comme chromogène capable de perturber le dosage de la créatinine totale dans l'urine, nous avons étudié, avec un résultat négatif, l'influence du gentisate de sodium administré par voie buccale.

Que l'albumine ne gêne pas le dosage de la créatinine urinaire, c'est ce que nous avons établi au cours de dosages systématiques, effectués sur des urines albumineuses, avant et après défécation.

o
o o

- INDEX BIBLIOGRAPHIQUE -
=====

- (I) ACHARD (C.), LEVY (J.) et POTOP (I.) :
Sur la créatinine ultrafiltrable. C.R. Soc. Biol., 1933,
II3, 658; cité par KAYSER (69).
- (2) AKAWATSU (S.) et KANAI (Y.) :
Bacterial decomposition of creatinine. I. Creatinomutase.
Enzymologia, 1952, 15, 122; in Chem. Abstr., 1953, 47,
6996 a.
- (3) ALBANESE (A.A.) et WINGERIN (D.M.) :
The creatine and creatinine excretion of normal adult
males. Science, 1944, 100, 51.
- (4) AMES (S.R.) et RISLEY (H.A.) :
Determination of creatine, creatinine and related compounds
in urine by means of paper chromatography. Proc. Soc.
exp. Biol. Med., 1948, 69, 267.
- (5) ANKER (R.M.) :
The determination of creatine and creatinine in urine.
A correction factor for the determination of 24 h urinary
excretion values. J. lab. clin. Med., 1954, 43, 798.
- (6) B'RAO (G.) et DELVENNE (J.) :
Dosage photométrique de la créatinine en solution pure et
dans l'urine. Bull. Soc. Chim. biol., 1946, 28, 625.
- (7) BARCLAY (J.A.) et KENNEY (R.A.) :
A method for the estimation of creatinine. Biochem. J. 1947,
41, 586.
- (8) BARRETT (J.F.) :
A simple test for nitrogen retention in the blood. Lancet,
1936, I, 84; in Chem. Abstr., 1936, 30, 38494.
- (9) BEARD (H.H.) :
Creatine and creatinine metabolism. Chemical Publishing,
Brooklyn, 1943.
- (10) BEHRE (J.) et BENEDICT (S.) :
Studies in creatine and creatinine metabolism. IV. On the
question of the occurrence of creatinine and creatine in
blood. J. biol. Chem., 1922, 52, 11; cité par KAYSER (69).
- (II) BENEDICT (S.) :
A method for the purification of picric acid for creati-
nine determinations. J. biol. Chem. 1922, 54, 239; cité
par KAYSER (69).

- (12) BENEDICT (S.) et BEHRE (J.) :
Some applications of a new color reaction for creatinine.
J. biol. Chem., 1936, 115, 515.
- (13) BLAIZOT (J.) :
Sur le dosage des corps créatiniques dans l'urine. Bull.
Soc. Chim. biol., 1950, 32, 136.
- (14) BLEGEN (E.), HAUGEN (H.N.) et AAS (K.) :
Endogenous "creatinine" clearance. Scand. J. clin. lab.
Invest., 1949, 1, 191.
- (15) BLOCH (J.M.) :
Sur quelques propriétés chimiques et physiques de la
montmorillonite. Thèse Sc. phys. Soc. d'impr. typogr.,
Nancy, 1950.
- (16) BOLLIGER (A.) :
The colorimetric determination of creatinine in urine
and blood with 3,5-dinitrobenzoic acid. Med. J. Australia,
1936, 2, 818; cité par VAGUE et DUNAN (110).
- (17) BOLLIGER (A.) :
The chemistry of Jaffé reaction for creatinine. J. Proc.
Roy. Soc. N. S. Wales, 1937, 80, 357; cité par VAGUE et
DUNAN (110).
- (18) BONSNES (R.W.) et TAUSKY (H.H.) :
On the colorimetric determination of creatinine by the
Jaffé reaction. J. biol. Chem., 1945, 158, 581.
- (19) BORSOOK (H.) :
Micromethods for determination of ammonia, urea, total
nitrogen, uric acid, creatinine (and creatine) and
allantoin. J. biol. Chem., 1935, 110, 481.
- (20) BORSOOK (H.) et DUENOFF (J.W.) :
The hydrolysis of phosphocreatine and the origin of
urinary creatinine. J. biol. Chem., 1947, 168, 493.
- (21) BRANDENBERGER (H.) :
The oxidation of uric acid to oxonic acid (allantoxanic
acid) and its application in tracer studies of uric
acid biosynthesis. Biochem. biophys. Acta, 1954, 15, 108.
- (22) BROD (J.) et SIROTA (J.H.) :
The renal clearance of endogenous "creatinine" in man. J.
clin. Invest., 1948, 27, 645.
- (23) CAHN (TH.), HOUGET (J.) et JACQUOT (R.) :
Modifications chimiques accompagnant la contraction musculaire et l'hyperthermie. I. Description et critiques des méthodes analytiques. Ann. Physiol. et Phys. Chim. biol., 1933, 2, 205; cité par KAYSER (69).

- (24) CAMARA (A.), ARN (K.), REIMER (A.) et NEWBURGT (L.) :
The twenty four hourly endogenous creatinine clearance as a clinical measure of the functional state of the kidneys. J. lab. clin. Med., 1951, 37, 743.
- (25) CANELLAKIS (E.) et COHEN (P.) :
On the nature of oxonic acid and allantoxaidin as oxidation products of uric acid and allantoin. J. biol. Chem., 1955, 213, 379.
- (26) CARR (J.) : Reactions of aromatic nitro compounds with active methyl, methylene, methine groups in presence of base. Determination of creatinine with alkaline 3,5-dinitrobenzoate. Anal. Chem., 1953, 25, 1859.
- (27) CLARK (L.) et THOMPSON (H.) :
Determination of creatine and creatinine in urine. Anal. Chem., 1949, 21, 1218.
- (28) DIRR (K.) et SCHADE (H.L.) :
Vergleichende Untersuchungen über einige Kreatinbestimmungsmethoden und die Beeinflussung der Jaffé-Reaktion durch verschiedene Stoffe, hauptsächlich durch Medikamente. Z. f. ges. exp. Med., 1937, 100, 20.
- (29) DOERING (P.), SCHROETER (H.), SCHUBERT (W.) et SCHWAB (M.) :
Die endogene Kreatininclearance beim nierengesunden Menschen. Klin. Wochenschr., 1953, 31, 301.
- (30) DOERING (P.), KOCH (R.), SCHROETER (H.) et SCHWAB (M.) :
Die endogene Kreatininclearance beim nierenkranken Menschen. Klin. Wochenschr., 1953, 31, 489.
- (31) DUBOS (R.) et MILLER (B.F.) :
The production of bacterial enzymes capable of decomposing creatinine. J. biol. Chem., 1937, 121, 429.
- (32) DUMAZERT (C.) et EL OUACHI :
Sur le métabolisme des salicylates. Ann. pharm. franç., 1954, 12, 723.
- (33) FISHER (R.) et WILHELM (A.) :
A micromethod for the determination of creatine and creatinine. Biochem. J., 1937, 31, 1131.
- (34) FOLIN (O.) :
Beitrag zur Chemie des Kreatinins und Kreatins im Harn. Z. physiol. Chem., 1904, 41, 223; cité par KAYSER (69).
- (35) FOLIN (O.) :
On the determination of creatinine and creatine in urine. J. biol. Chem., 1914, 17, 469; cité par HUNTER (64)

- (36) FOLIN (O.) :
On the determination of creatinine and creatine in blood, milk and tissues. J. biol. Chem., 1914, 17, 475; cité par HUNTER (64)
- (37) FOLIN (O.) :
Note on the necessity of checking up the quality of sodium tungstate used in the system of blood analysis. J. biol. Chem., 1922, 51, 419; cité par HUNTER (64).
- (38) FOLIN (O.) et DOISY (E.) :
Impure picric acid as a source of error in creatine and creatinine determinations. J. biol. Chem., 1917, 28, 349; cité par KAYSER (69).
- (39) FOLIN (O.) et SVEDBERG (A.) :
The sugar in urine and in blood. J. biol. Chem., 1926, 70, 405.
- (40) FOLIN (O.) et WU (H.) :
A system of blood analysis. J. biol. Chem., 1919, 38, 81; cité par KAYSER (69).
- (41) FONTY (P.) :
Modification proposée à la méthode de Folin-Malmrös. Ann. Biol. clin., 1950, 8, 312.
- (42) FRANZEN (F.) et GÖDEN (H.) :
Über die technisch-physikalische Seite bei den bisher üblichen Kreatinkörper-Bestimmungsmethoden in der Medizin (unter gleichzeitiger Angabe eines photoelektrischen Keil-Colorimeters) sowie einige Bemerkungen über die Fällbarkeit und die Trennbarkeit von Kreatin und Kreatinin. Z. f. ges. exp. Med., 1950, 116, 1.
- (43) GAEBLER (O.) :
Further studies on blood creatinine. J. biol. Chem., 1930, 89, 451; cité par KAYSER (69).
- (44) GAEBLER (O.) et KELTCH (A.) :
On the nature of blood creatinine. J. biol. Chem., 1928, 76, 337; cité par KAYSER (69).
- (45) GARNER (R.J.) :
Determination of creatinine. Nature, 1952, 170, 460.
- (46) GRANT (R.) :
Excretion and plasma clearance of endogenous true creatinine in rabbits. Am. J. Physiol., 1953, 174, 79.
- (47) GREENWALD (I.) :
The chemistry of Jaffé's reaction for creatinine. II. The effect of substitution in the creatinine molecule and a possible formula for the red tautomer. J. Am. Chem. Soc., 1925, 47, 1443; cité par KAYSER (69).

- (61) HERBAIN (M.) :
Sur une réaction céruléoferrique applicable au microdosage du glucose. Bull. Soc. Chim. biol., 1949, 31, 1104.
- (62) HERVEY (G.R.) :
Determination of creatinine by the Jaffé reaction. Nature, 1953, 171, 1125.
- (63) HOLMES (E.G.) et HOLMES (B.E.) :
A note on the reducing substances found in alcoholic extracts of brain. Biochem. J., 1926, 20, 596.
- (64) HUNTER (A.) :
Creatine and Creatinine. Longmans, London, 1928.
- (65) HUNTER (A.) et CAMPBELL (W.) :
The distribution of creatinine and creatine between the corpuscles and plasma of the blood. J. biol. Chem., 1917, 29, XVIII; cité par HUNTER (64).
- (66) HUNTER (A.) et CAMPBELL (W.) :
The probable accuracy, in whole blood and plasma, of colorimetric determinations of creatinine and creatine. J. biol. Chem., 1917, 32, 195; cité par HUNTER (64).
- (67) JAFFE (M.) :
Über den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins, Z. physiol. Chem., 1886, 10, 391; cité par KAYSER (69).
- (68) KANTUREK (V.), PACOVSKY (V.) et SONKA (J.) :
O specificitě Lloydova činidla při stanovení kreatininu v seru. Čas. Lék. Čes., 1954, 93, 435.
- (69) KAYSER (F.) :
Créatine et créatinine. Hermann, Paris, 1934.
- (70) KAYSER (F.) :
Métabolismes des corps créatiniques. Hermann, Paris, 1934.
- (71) KOSTIR (J.V.) et PRISTOUPIL (T.I.) :
Paper chromatography of glucocycamidine in urine. Čas. Lék. Čes., 1953, 92, 188; in Chem. Abstr. 1955, 49, 1132 i.
- (72) KOSTIR (J.V.) et RABEK (V.) :
The detection of Jaffé-positive substance in blood serum by paper partition chromatography. The problem of apparent creatinine. Biochim. biophys. Acta, 1950, 5, 210.
- (73) KOSTIR (J.V.) et SONKA (J.) :
Creatinine estimation in blood serum. A new method. Biochim. biophys. Acta, 1952, 8, 86.

(74) LAGRANGE (G.) :

Dosage de la créatinine en chimie alimentaire. Note préliminaire. Bull. Soc. chim. Belg., 1942, 51, 113.

(75) LAMBERT (F.) :

The determination of creatine and creatinine. J. biol. Chem., 1945, 161, 679.

(75bis) LANGERON (L.), PAGET (M.), NOLF (V.) et LIEFOOGHE (J.) :

Comparaison entre la créatinine-clearance et l'hyposulfite-clearance comme procédé d'exploration fonctionnelle du rein. Presse méd., 1955, 63, 1021 et Ann. Biol. clin., 1955, 13, 384.

(76) LANGLEY (W.) et EVANS (M.) :

The determination of creatinine with sodium 3,5-dinitrobenzoate. J. biol. Chem., 1936, 115, 333.

(77) LAUSON (H.) :

Sources of error in plasma creatinine determination. J. appl. Physiol., 1951, 4, 227.

(78) LEHNARTZ (E.) :

The determination of creatine in muscle by the dinitrobenzoate method. Z. physiol. Chem., 1941, 271, 265; in Chem. Abstr., 1943, 37, 3117₆.

(79) LINNEWEH (F.) et LINNEWEH (W.) :

Über Fehlerquellen der colorimetrischen Kreatin- und Kreatininbestimmung nach dem Folinschen Prinzip. Klin. Wochenschr., 1934, 13, 589; cité par DIRR et SCHADE (28).

(80) LØKEN (F.) :

On the determination of creatinine in plasma by the Jaffé reaction, after adsorption to Lloyd's reagent. Scand. J. clin. lab. Invest., 1954, 6, 325.

(81) MANDEL (E.) et JONES (F.) :

Studies in nonprotein nitrogen. III. Evaluation of methods measuring creatinine. J. lab. clin. Med., 1953, 41, 323.

(82) MANDEL (E.), JONES (F.), WILLIS (M.) et CARGILL (W.) :

Renal excretion of creatinine and inulin in man. J. lab. clin. Med., 1953, 42, 621.

(83) MAW (G.) :

The detection of creatine and creatinine by partition chromatography. Biochem. 1, 1948, 43, 139.

(84) MILLER (B.F.) et DUBOS (R.) :

Studies on the presence of creatinine in human blood. J. biol. Chem., 1937, 121, 447.

(85) MILLER (B.F.) et DUBOS (R.) :

Determination by a specific, enzymatic method of the creatinine content of blood and urine from normal and nephritic individuals. J. biol. Chem., 1937, 121, 457.

(86) MILLER (Z.) et MILLER (B.F.) :

Specific determination of serum creatinine. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1951, 78, 471.

(87) OWEN (J.), IGGO (B.), SCANDRETT (F.) et STEWART (C.) :

The determination of creatinine in plasma or serum, and in urine; a critical examination. Biochem. J., 1954, 58, 426.

(88) PAGET (M.) :

L'élimination rénale. Exp. ann. Biochim. méd., 1954, XVI^e série, 99.

(89) PAGET (M.) et LAFFORGUE (C.) :

Technique de défécation destinée à remplacer la défécation trichloracétique en vue du dosage de divers constituants sanguins. Bull. Soc. Chim. biol., 1942, 24, 1101.

(90) PETERS (J.H.) :

The determination of creatinine and creatine in blood and urine with the photoelectric colorimeter. J. biol. Chem., 1942, 146, 179.

(91) PLUMEL (M.) :

Dosage des sucres réducteurs par le ferricyanure en milieu alcalin. Bull. Soc. Chim. biol., 1949, 31, 1163.

(92) PLUMEL (M.) :

Microdosage colorimétrique des oses. Ann. Biol. clin., 1951, 9, 307.

(93) POPPER (H.), MANDEL (E.) et MAYER (H.) :

Zur Kreatininbestimmung im Blute. Biochem. Z., 1937, 291, 354.

(94) REHBERG (P.B.) :

Studies on kidney function. I. Biochem. J., 1926, 20, 448; cité par KAYSER (59).

(95) ROCHE (J.), LACOMBE (G.) et GIRARD (H.) :

Sur la spécificité de certaines déguanidases bactériennes génératrices d'urée et sur l'arginine-dihydrolase. Biochim. biophys. Acta, 1950, 6, 210.

- (96) ROSCOE (M.H.) :
The estimation of creatinine in serum. J. clin. Path.,
1953, 6, 201.
- (97) RÖTTGER (H.) :
Über die Bestimmung des Kreatinins und Kreatins im
Harn und im Serum mit der Dinitrobenzoatmethode.
Biochem. Z., 1949, 319, 359.
- (98) SALVIAT (P.) :
Contribution à l'étude des dosages de la créatine et
de la créatinine. Thèse de Pharmacie, Strasbourg,
1947.
- (99) SANDBERG (A.), HECHT (H.) et TYLER (F.) :
Studies in disorders of muscle. X. The site of creatine
synthesis in the human. Metabolism, 1953, 2, 23.
- (100) SCHOCH (H.) et CAMARA (A.) :
Endogenous creatinine clearance. Meth. med. Res., 1953,
5, 214.
- (101) SCHWAB (M.) :
Die endogene 24 Stunden-Kreatininclearance - eine
brauchbare Methode zur Bestimmung des Glomerulusfil-
trates. Klin. Wochenschr., 1953, 31, 1030.
- (102) SODA (T.), YOSHIDA (A.) et OIKAWA (A.) :
Creatinine formation from creatine by yeast. J. Biochem.
Tokyo Univ., 1953, 40, 421.
- (103) SOLTI (F.) :
Adjustment of the colorimetric determination of creati-
nine to the Autenrieth apparatus. Kis. Orvost., 1949,
1, 126; in Chem. Abstr., 1951, 45, 1636a.
- (104) STELGENS (P.) :
Über die Kreatinkörperbestimmung mit Kaliumquecksilberrho-
daniid und Dithizon. Biochem. Z. 1953, 324, 228.
- (105) STELGENS (P.), WOLF (H.) et SCHREIER (K.) :
Eine neue Kreatininbestimmungsmethode. Klin. Wochenschr.,
1950, 28, 318.
- (106) STELGENS (P.), WOLF (H.) et SCHREIER (K.) :
Eine colorimetr. Mikromethode zur Bestimmung des
Kreatinins und Kreatins im Blut und Harn. Z. physiol.
Chem., 1950, 286, 218.
- (107) SUDENDORF (T.) et LAHRMANN (O.) :
Über die Bestimmung des Fleischextraktgehaltes in
Bouillonwürfeln. Z. Unters. Nahr. Genussm., 1915, 29,
1; cité par HUNTER (64).

- (108) SULLIVAN (M.X.) et IRREVERRE (F.) :
A new and highly specific test for creatinine. J. biol. Chem., 1939, 128, CI.
- (109) TAUSKY (H.H.) :
A microcolorimetric determination of creatine in urine by the Jaffé reaction. J. biol. Chem., 1954, 208, 853.
- (110) VAGUE (J.) et DUNAN (J.) :
La créatine. Masson, Paris, 1939.
- (111) VON FRIJTAG DRABBE (C.) et REINHOLD (J.) :
Note on the stability of creatinine in neutral and alkaline urine. J. lab. clin. Med., 1952, 39, 163.
- (112) WALDBOTT (S.) :
Precipitating alkaloids by Lloyd's reagent. Preliminary note. J. Am. Chem. Soc., 1913, 35, 837.
- (113) WEISE (W.) et TROPP (C.) :
Untersuchungen über die Jaffésche Pikrinsäure-reaktion. Z. physiol. Chem., 1928, 178, 125; cité par KAYSER (69).
- (114) WOLF (R.) et DE LAVERGNE (E.) :
Recherches sur le microdosage du glucose par colorimétrie photoélectrique. C.R. Soc. Biol., 1947, 141, 926.
- (115) ZACHERL (H.K.) :
Untersuchungen über den Kreatin- und Kreatinin-stoffwechsel. IV. Isolierung von Kreatinin neben Kreatin aus Rinderblutserum. Z. physiol. Chem., 1937, 248, 69; in Chem. Zentralbl., 1937, II, 3188.
- (116) ZIMMERMANN (W.) :
Eine Farbreaktion der Sexualhormone und ihre Anwendung zur quantitativen colorimetrischen Bestimmung. Z. physiol. Chem., 1935, 233, 257; in Chem. Zentralbl., 1935, II, 872.
- (117) ZIMMERMANN (W.) :
Colorimetrische Bestimmung der Keimdrüsenhormone. II. Z. physiol. Chem., 1936, 245, 47; in Chem. Zentralbl., 1937, I, 1715.

Vu,
NANCY, le 26 Novembre 1955.
Le Président de thèse,
F. KAYSER.

Vu et approuvé
NANCY, le 26 Novembre 1955.
Le Doyen de la Faculté,
F. KAYSER.

Vu et permis d'imprimer
NANCY, le 26 Novembre 1955.
Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université,
G. MAYER.

